

IN VITRO PRODUKTION VON RINDEREMBRYONEN

Elisabeth Gratl

Disbui. München

1988

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht:

Professor Dr. Dr. habil. G. Brem

IN VITRO PRODUKTION

VON RINDEREMBRYONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Elisabeth Gradl

aus

Chieming

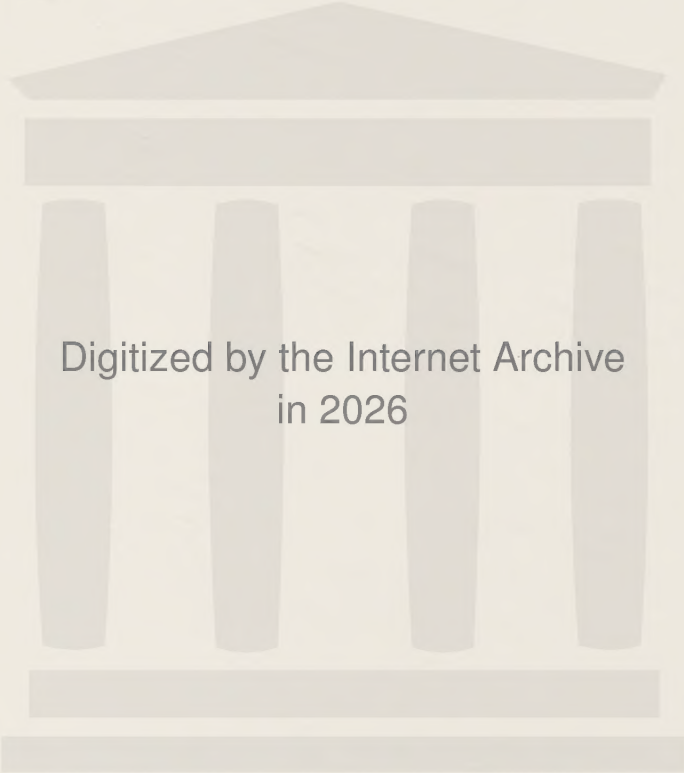
München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. Dr. habil. G. Brem
Korreferent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

In Dankbarkeit und Liebe meinen Eltern und meinem Mann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1 Die Reifung von Oozyten in vivo	2
2.1.1 Die Kernreifung	3
2.1.2 Die Zytoplasmareifung	4
2.1.3 Die Follikelreifung	5
2.1.4 Biochemische Regulation der Meiose	8
2.2 Die Reifung von Rinderoozyten in vitro	10
2.2.1 Geschichte	10
2.2.2 Zielsetzung	10
2.2.3 Einflüsse	11
2.2.3.1 Oozyten	11
2.2.3.2 Medien und Zusätze	13
2.2.3.3 Inkubationssysteme	16
2.3 Die Fertilisation von Rinderoozyten in vivo	18
2.3.1 Die Kapazitation und Akrosomreaktion	18
2.3.2 Biochemie von Kapazitation und Akrosomreaktion	21
2.3.3 Penetration, Aktivierung und Fusion	23
2.4 Die Fertilisation von Rinderoozyten in vitro	25
2.4.1 Geschichte	25
2.4.2 Zielsetzung	26
2.4.3 Einflüsse	26
2.4.3.1 Kapazitationsmethoden	26
2.4.3.2 Spermien	29
2.4.3.3 Oozyten	32
2.5 Die Kultur von Rinderembryonen in vitro	35

3. MATERIAL UND METHODE	40
3.1 Medien	40
3.2 Gewinnung der Oozyten und Granulosazellen	41
3.3 Oozytenreifung in Kokultur mit Granulosazellen	44
3.4 Vorbereitung der Oozyten für die IVF	45
3.5 Spermaaufbereitung	46
3.6 In vitro Fertilisation	47
3.7 In vivo Kultur	48
3.8 Statistische Analysen	50
4. ERGEBNISSE	51
4.1 In vitro Reifung (IVM) von Rinderoozyten	51
4.1.1 IVM, gesamt	51
4.1.2 IVM, Versuchsreihen	53
4.1.3 Hormonanalysen	55
4.2 In vitro Fertilisation (IVF)	55
4.2.1 Unterschiede zwischen verschiedenen Bullen	56
4.2.2 Oozytenvorbereitung	59
4.2.3 Reifungsbedingungen	62
4.3 In vivo Kultur	66
4.4 Effizienz von IVM und IVF Programmen	70

5. DISKUSSION	71
5.1. Einfluß von Kulturbedingungen auf die vollständige Reifung von Rinderoozyten	71
5.2 Einfluß der Oozytenvorbereitung auf Fertilisierbarkeit und Weiterentwicklungsfähigkeit	75
5.3 Einfluß der in vitro Fertilisationsfähigkeit einzelner Bullen auf die Fertilisationsergebnisse	79
5.4 Effizienz der IVM und IVF Programme	80
6. ZUSAMMENFASSUNG	82
7. SUMMARY	84
8. LITERATURVERZEICHNIS	86
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109

1. EINLEITUNG

Die Anwendung neuer Zuchtungstechniken wie Gen- und Nukleustransfer zur Steigerung des züchterischen Fortschritts bei landwirtschaftlichen Nutztieren, aber auch die Grundlagenforschung in der Reproduktionsbiologie, sind durch den hohen finanziellen und personellen Aufwand bei der Gewinnung der dazu benötigten frühen Embryonalstadien limitiert.

Die *in vitro* Produktion von Rinderembryonen, d.h. die *in vitro* Reifung (IVM) und *in vitro* Fertilisation (IVF) von Oozyten, die aus Tertiärfollikeln von Ovarien geschlachteter Färsen und Kühe gewonnen werden, würde eine kostengünstige Verfügbarkeit von Embryonen für die genannten und weitere Anwendungsgebiete gewährleisten.

Allerdings ist die Effektivität der *in vitro* Produktion von Rinderembryonen mit derzeit wenig mehr als 10 % lebenden Nachkommen deutlich geringer als unter *in vivo* Bedingungen (First und Parrish, 1987).

Für die niedrigen Erfolgsraten bei der *in vitro* Produktion von Embryonen landwirtschaftlicher Nutztiere wird vor allem eine unvollständige Reifung verantwortlich gemacht, zu deren ungestörtem Ablauf, neben der Vollendung der Meiose, auch Zytoplasma- und Follikelreifung gehören.

Neuere Untersuchungen beim Schaf und auch beim Rind ergaben, daß neben Hormonen (insbesondere Östrogene) vor allem Follikelzellen eine entscheidende Bedeutung für eine vollständige, physiologische Oozytenreifung haben (Staigmilller und Moor, 1984; Critser et al., 1986). Dies konnte in vorangehenden Versuchen am Institut für Tierzucht bestätigt werden (Lutterbach, 1987).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluß verschiedener Modifikationen der Kokultur von Rinderoozyten mit Granulosazellen auf eine physiologische Oozytenreifung zu untersuchen. Überprüft wurden verschiedene Inkubationssysteme (statisch - geschüttelt), Reifungstemperaturen (37°C - 39°C) und Medienzusätze (17- β -Östradiol, Retinol).

2. LITERATUR

2.1 Die Reifung von Oozyten in vivo

Während der frühen embryonalen Entwicklung wandern die Urkeimzellen von der Dottersackregion zur Genitalleiste. Hier teilen sich die weiblichen Keimzellen mitotisch bis zu einer speziesspezifischen Endzahl (Vermehrungsperiode) und differenzieren sich zu Oogonien (Sato und Koide, 1987).

In der anschließenden Wachstumsperiode werden sie zu Oozyten I. Ordnung und treten, nach Replizierung ihres genetischen Materials, gemeinsam in die Meiose I ein. Der Rinderembryo hat zu diesem Zeitpunkt eine Scheitelsteißlänge von 120 mm.

Vor oder kurz nach der Geburt wird die Prophase I der ersten Reifeteilung bis zum Diplotän fortgesetzt und hier unterbrochen. Es folgt eine - Germinalvesikelstadium oder Diktyotän genannte - Ruhe- oder Warteperiode, in der die Chromosomen dekontensieren und diffus verteilt im Kern der Oozyte (Germinalvesikel) vorliegen. Die Oozyten verharren im Diktyotän bis zum Eisprung (Sato und Koide, 1987; Rüsse, 1982; Barckhausen, 1981).

Der Zeitraum vom Erscheinen des Germinalvesikels über die Meiose I zur Meiose II bis zum Abschnüren des 1. Polkörperchens wird im allgemeinen als Oozytenreifung bezeichnet, obwohl hierbei nur die Kernreifung berücksichtigt wird (First und Parrish, 1987). Die vollständige Reifung von Oozyten umfaßt aber eine komplexe, zeitlich genau festgelegte Abfolge von morphologisch-strukturellen, physiologisch-metabolischen und biochemischen Vorgängen, sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma und dem die Oozyte umgebenden Follikel. Nur der physiologische Ablauf von Kern-, Zytoplasma- und Follikelreifung zusammen verleihen der Oozyte die Fähigkeit zu einer normalen Befruchtung und embryonalen Entwicklung. Ausgelöst werden all diese Ereignisse von dem gonadotropen Hormon LH (luteinisierendes Hormon) (Albertini, 1984; Kaplan et al., 1978; Tsafiri, 1978).

2.1.1 Die Kernreifung

Ab Eintritt der Geschlechtsreife wird mit jedem ovariellen Zyklus eine bestimmte Anzahl von Oozyten dazu angeregt die Meiose fortzusetzen. Hierbei spielen sich folgende charakteristische morphologische Veränderungen an Zellkern und Chromosomen ab. Zuerst nimmt die Kernmembran eine wellenförmige Gestalt an (Hyttel et al., 1987), um sich danach aufzulösen-GVBD (germinal vesicle breakdown) (Motlik et al., 1978). Gleichzeitig kondensiert das Chromatin und bildet deutlich sichtbare Chromosomen (Diakinese). Nach einer weiteren Kontraktion der Chromosomen wird der Spindelapparat gebildet und die Chromosomen paarweise in der Mitte der Spindel angeordnet (Metaphase I). Die meiotische Spindel nimmt eine periphere Position ein und die gepaarten homologen Chromosomen werden getrennt (Anaphase I). Es folgt die Bildung und Abschnürung des 1.Polkörperchens (Telophase I), womit die erste meiotische Teilung beendet ist (Sato und Koide, 1987).

Die Fähigkeit zur Vollendung der 1.meiotischen Teilung besitzen nur Oozyten, die ihre endgültige Größe erreicht haben (Motlik und Fulka, 1986a).

Ohne vorherige DNA-Synthese (S-Phase) schließt sich die Meiose II an und wird bis zur Metaphase fortgesetzt. Die Chromosomen in der Oozyte sind in der Metaphaseplatte angeordnet und verbleiben so, bis bei einer eventuellen Befruchtung der Oozyte II.Ordnung, die Meiose II vollendet wird (Masui und Clarke, 1979; Barckhausen et al., 1981).

Die Oozyte befindet sich während des Diostrus meist im Pachytän oder Diplotän der Prophase I. Im Proostrus wird üblicherweise die erste Reifeteilung vollzogen, so daß bei den Haustieren meistens eine Oozyte II.Ordnung (Metaphase II) ovuliert wird (exkl. Pferd) (Kanagawa et al., 1986).

Im Gegensatz zu diesen ausgeprägten strukturellen Veränderungen sind die biochemischen Aktivitäten der reifenden Oozyte vermutlich gering. Ausgeprägte Synthese von RNA findet vor allem in der Wachstumsphase statt (Motlik und Fulka, 1986).

2.1.2 Die Zytoplasmareifung

Parallel mit der Kernreifung erfolgt in der Oozyte eine Reifung des Zytoplasmas, die von grundlegender Bedeutung für die Fertilisierbarkeit und Weiterentwicklungsfähigkeit der Oozyte ist (Ball et al., 1984; Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Als ein bemerkenswertes Beispiel sei die Bildung des male pronuclear growth factors (MPGF) im Zytoplasma der reifenden Oozyte genannt (Thibault et al., 1975; Thibault, 1977). Nur hinsichtlich der Zytoplasmareifung vollständig gereifte Oozyten sind in der Lage ein eindringendes Spermium in einen männlichen Vorkern umzugestalten. Das Zytoplasma von unreifen Oozyten besitzt diese Fähigkeit nicht.

Es wird angenommen, daß dieser Teil der zytoplasmatischen Reifung von der Kernreifung abhängig ist (Balakier und Tar-kowski, 1980).

Daneben wird auch die Unfähigkeit einer Zygote sich zur Blastozyste zu entwickeln einer ungenügenden Zytoplasmareifung zugeschrieben (Staigmilller und Moor, 1984; Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Die Ursache der ungenügenden Zytoplasmareifung und ihrer Folgen ist vor allem eine unangemessene Versorgung der Oozyte mit Steroiden durch den Follikel, wovon besonders Östrogen für die zytoplasmatische Reifung essentiell ist (Moor, 1978). Auch über den Einfluß eines regulatorischen Proteins wird berichtet (Leibfried und Bavister, 1983).

Strukturellen Ausdruck findet die Zytoplasmareifung einerseits in Veränderungen des Zytoskeletts, die in direktem Zusammenhang mit der Kernreifung stehen, wie die Bildung des Spindelapparates. Andererseits zeigen sich, als Zeichen der metabolischen Aktivität der Oozyte, Veränderungen in Lage, Struktur und Anzahl der Zellorganellen und -einschlüsse, einschließlich einer gleichmäßigen Verteilung der Mitochondrien und einer Zunahme und peripheren Anordnung der kortikalen Granula (Hyttel et al., 1986a,b; Kruip et al., 1983;

Wassarman et al., 1979; Rüsse, 1978).

Es ist bekannt, daß aufgrund dieser morphologischen Umgestaltungen des Zytoplasmas eine Reihe qualitativer Veränderungen des Proteinmusters stattfinden, die in engem Zusammenhang mit einer physiologischen Reifung stehen (Schultz und Wassarman, 1977a; Moor et al., 1983).

Vor allem die Bildung von Proteinen im Zytoplasma, die die Meiose, die ungestörte Fertilisation und embryonale Entwicklung steuern ist wichtig (First und Parrish, 1987).

Die Annahme, daß der Anstoß zur Bildung neuer Proteine in einer Vermischung von Zyto- und Nucleoplasma zum Zeitpunkt des GVBD begründet liegt, bei der im Zytoplasma vorhandene mRNAs mobilisiert werden, konnte nicht bewiesen werden (Schultz und Wassarman, 1977a,b; Schultz et al., 1978).

Durch Versuche mit dem Meiose- und Proteinsynthesehemmer α -Amanitin konnte gezeigt werden, daß ein "transkriptionelles Ereignis" am Beginn der Reifung, und noch vor dem Bruch des Germinalvesikels, von grundlegender Bedeutung für die Veränderungen der Proteinsynthese sind, die für die Steuerung sowohl der Kern- als auch der Zytoplasmareifung benötigt werden. Es ist jedoch unklar, ob diese Transkription innerhalb der Oozyte oder in den Kumuluszellen stattfindet (Osborn und Moor, 1983).

Neueste Untersuchungen haben ergeben, daß neusynthetisierte mRNA und Proteine, bei Haustieren, im Gegensatz zu Labortieren, für die Fortsetzung der Meiose Voraussetzung sind (Hunter und Moor, 1987).

2.1.3 Die Follikelreifung

Die Follikelreifung gliedert sich in Follikulogenese und Follikelwachstum.

Als Follikulogenese wird die Bildung des Primär- oder Primordialfollikels durch Umhüllung der primären Oozyte mit einer Schicht aus schmalen Epithelzellen bezeichnet. Diese Entwick-

lung findet pranatal statt und zwar an nur relativ wenigen Coryten in der Nahe der Gonadenoberfläche. Die Mehrzahl der bis dahin gebildeten Oogonien und primären Oozyten degeneriert. Auch zum anschließenden Follikelwachstum wird nur eine geringe Anzahl von Primärfollikeln stimuliert. Von diesen wiederum entwickeln sich nur wenige bis zur Ovulation weiter, oder, was viel häufiger geschieht, enden in Zelltod oder Atresie (Langman, 1980; Cran und Moor, 1980).

Das Follikelwachstum ist durch zwei Phasen gekennzeichnet. Die erste Phase ist eine parallel zum Oozytenwachstum stattfindende mitotische Zunahme der Granulosazellen, die sich in Schichten um die Oozyte anordnen (Sekundärfollikel). In der zweiten Phase resultiert das Follikelwachstum vor allem aus der Bildung der flüssigkeitsgefüllten Follikelhöhle oder des Antrum folliculi. Hierbei bleibt die Größe der Oozyte annähernd konstant (Lussier et al., 1987; Moor und Warnes, 1978). Der nun entstandene Tertiär-, Graaf'sche- oder antrale Follikel wird von zwei Bindegewebsschichten umgeben, die unter dem Einfluß der Granulosa gebildet wurden: die innere, gefäßreiche Theka interna und die äußere fibröse Theka externa (Langman, 1980; Moor und Cran, 1980).

Durch die Bildung des Antrums wird beim Tertiärfollikel zwischen wandständiger Granulosa und die Oozyte II.Ordnung umgebenden Cumulus oophorus unterschieden. Die Oozyte steht mit ihren Kumuluszellen (heterologe Kopplung), und die Granulosazellen untereinander (homologe Zellkopplung) über gap junctions in Verbindung (Moor und Seamark, 1986; Moor et al., 1980a; Eppig und Ward-Bailey, 1982; Motlik et al., 1986; Hyttel et al., 1986a). Während der Reifung der Oozyte werden diese Verbindungen unterbrochen (Hyttel et al., 1986b). Dadurch wird Hyaluronsäure freigesetzt (Eppig, 1980a), was letztlich zur Kumulusexpansion führt, die lichtmikroskopisch als ein Zeichen der Oozytenreifung definiert ist (Motlik et al., 1986).

Von den verschiedenen Faktoren, die die Reifung beeinflussen, stammen viele vom Follikel, d.h. die Reifung, zumindest der

Säugetieroozyten, ist in hohem Maße vom Follikel abhängig (Masui und Clarke, 1979). So benötigen Oozyten für die Vollendung der vollständigen Reifung (s. Zytoplasmareifung) eine spezifische, intrafollikuläre Umgebung von Steroiden (Moor et al., 1980b; Thibault et al., 1975).

Wie schon erwähnt, erlangt nur ein kleiner Prozentsatz der vielen Follikel, die die Entwicklung beginnen, sein volles endokrines und gametogenes Potential. Die Auslöser dieser follikularen Selektion sind nur schlecht definiert, aber man weiß, daß sowohl intraovarielle Faktoren, als auch die klassischen gonadotropen Hormone LH und FSH (Follikel stimulierendes Hormon) zu ihnen gehören (Moor und Seamark, 1986).

Zwei Selektionshypothesen wurden entwickelt, von denen die eine die dominante Rolle der Gonadotropine und ihrer follikulären Rezeptoren betont, die andere postuliert, daß das Auftreten von Gonadotropinrezeptoren eher eine Folge denn die primäre Ursache der Follikelselektion ist (Richards, 1980; Midgley, 1973; Moor und Seamark, 1986).

Von den vielen verschiedenen zellulären Mechanismen, die Selektion, Differenzierung und Steroidhormonbildung im Follikel steuern, spielen vor allem die Veränderungen der thekalen Mikrozirkulation und Hamodynamik, die transkompartimentale und interzelluläre Signalübermittlung, sowie die intrafollikuläre Regulation der Proteinbiosynthese eine entscheidende Rolle.

Die Follikelselektion beruht also einerseits auf dem funktionellem Zusammenspiel der verschiedenen Follikelzellschichten, sowie andererseits auf einer angemessenen Antwort auf und einem hinreichenden Zugang zu den zirkulierenden Gonadotropinen (Moor und Seamark, 1986).

2.1.4 Biochemische Regulation der Meiose

Das Verharren der Oozyte im Diktyotän, bzw. das Fortsetzen der Meiose wird durch eine Vielfalt biochemischer Überträgerstoffe, deren Identität z.T. noch nicht geklärt ist, reguliert. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Faktoren gegeben werden.

Durch eine Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, daß in den Granulosazellen und der Follikelflüssigkeit Faktoren vorhanden sind, die die meiotische Ruhe der Oozyten aufrechterhalten (Foote und Thibault, 1969; Tsafiri und Channing, 1975a,b; Tsafiri et al., 1976; Tsafiri, 1978; Channing, 1978; Hillensjö et al., 1978; Eppig und Downs, 1984; Downs et al., 1985).

Hierzu gehören das zyklische Nukleotid cAMP (cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphat) und seine potenzierenden Faktoren Hypoxantin und 17- β -Östradiol, sowie die meiosehemmenden Peptide OMI (oocyte maturation inhibitor) und GCF (granulosa cell factor), die vermutlich identisch sind (Masui und Clarke, 1979; Dekel und Beers, 1980; Moor und Heslop, 1981; Schultz et al., 1983a,b; Richter und McGaughey, 1979; Hillensjö et al., 1979; Racowsky, 1983; Racowsky und McGaughey, 1982; Tsafiri und Channing, 1975a,b; Channing et al., 1982; Tsafiri et al., 1976; Eppig und Downs, 1984; Downs et al., 1985; Sato et al., 1982 und 1986; Sato und Koide, 1984).

Der wichtigste meioseauslösende Faktor ist unbestritten LH. Indirekt soll GnRH (gonadotropin releasing hormone) einen Einfluß haben, und über die Wirkung der Steroide existieren widersprüchliche Aussagen (Lindner et al., 1974; Tsafiri et al., 1972; Hay und Moor, 1975; Hillensjö et al., 1978; Channing und Tsafiri, 1977; Dekel und Kraicer, 1978; Moor et al., 1980a; Sato et al., 1986; Thibault, 1977; Bae und Foote, 1975; Richter und McGaughey, 1979).

Dem Kalziumspiegel innerhalb der Oozyte wird im Zusammenhang mit cAMP eine wichtige Rolle für die Reifung zugeschrieben (Powers und Paleos, 1982).

Im Zytoplasma reifender Oozyten wird außerdem der reifungsfördernde Maturation Promoting Factor (MPF) gebildet (Fulka, 1983).

Aufbauend auf den Erkenntnissen der genannten Arbeiten und auf eigenen Ergebnissen entwickelten Sato und Koide (1987) eine Hypothese zur Klärung der Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, ob die Meiose unterbrochen oder fortgesetzt wird.

Der GCF ist auf der Oberfläche und in den Interzellularräumen der Granulosazellen lokalisiert. Über direkten Kontakt zwischen den Granulosazellen und dem Kumulusoozytenkomplex kann GCF die meiotische Ruhe aufrechterhalten. GCF wirkt auf die Kumuluszellen, ruft einen Anstieg des intraoozytären cAMP-Spiegels hervor und unterdrückt den Kalziumtransport.

Gonadotropine (LH) regen die Bildung und Anhäufung von Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure ?) in den Interzellularspalten der Kumuluszellen an. Das Ergebnis ist eine Unterbrechung der gap junctions zwischen den Kumuluszellen und zwischen den Kumuluszellen und Oozyten, wodurch der Transport von Metaboliten innerhalb des Kumulusoozytenkomplexes behindert wird. Die Glykosaminoglykane sind in der Lage die Wirkung des GCF auf die Oozyten zu verhindern, indem sie den Faktor binden. Aus der Kumulusexpansion resultieren eine Verhinderung der Wirkung von Meiosehemmern, eine Abnahme des Flusses von essentiellen Nährstoffen zur Oozyte, sowie eine Unterbrechung des interzellulären Kommunikationssystems innerhalb des Follikels (uncoupling). Auf diese Weise ist die Oozyte vor dem Einfluß der meiosehemmenden Faktoren geschützt und setzt die Meiose fort.

2.2 Die Reifung von Rinderoozyten in vitro

2.2.1 Geschichte

Der erste Bericht über die Kultivierung von follikulären Rinderoozyten in vitro stammt von Edwards aus dem Jahre 1965. Seitdem wurden Rinder- und Kälberoozyten von vielen Forschern mit unterschiedlichem Erfolg in vitro gereift (zur Übersicht s. Lutterbach, 1987).

In den frühen Arbeiten wurde vor allem über die stattgefundene Kernreifung berichtet, aber es gibt nur wenige Aussagen über die Beurteilung der Lebensfähigkeit derart gereifter Oozyten (Trousens et al., 1977).

In der jüngsten Vergangenheit häufen sich die Berichte über die erfolgreiche Durchführung der in vitro Reifung (IVM) von Rinderoozyten (Critser et al., 1986; Leibfried-Rutledge et al., 1986a, 1987; Parrish et al., 1986; Greve et al., 1986; Kanagawa et al., 1986; Hanada et al., 1986; Xu et al., 1987a; Lu et al., 1987a; Iritani et al., 1987; Süss und Stranzinger, 1987a; Pavlok, 1987, persönliche Mitteilung).

Allen diesen neueren Arbeiten ist gemein, daß die Überlebensfähigkeit der Oozyten bzw. deren vollständige Reifung durch nachfolgende in vitro Fertilisation (IVF) und Übertragen der Embryonen auf Empfängertiere überprüft wird.

Bei einigen konnten sogar Trächtigkeiten bzw. lebende Kälber erzielt werden (Critser et al., 1986; Hanada et al., 1986; Xu et al., 1987a; Lu et al., 1987a; Iritani, 1987; Pavlok, 1987).

2.2.2 Zielsetzung

Auch in Anbetracht der jüngsten Erfolge auf dem Gebiet der in vitro Reifung, und trotz umfangreicher Anstrengungen ist unser Wissen über die Prozesse, die die Reifung in vivo kontrollieren noch weit von vollständigem Verstehen entfernt, und die richtige Auslösung all dieser Prozesse in vitro ist

sehr schwierig (Motlik und Fulka, 1986).

Die Entwicklung neuer Biotechnologien ist abhängig von der Massenproduktion bestimmter Embryonalstadien, und damit, speziell beim Rind, von in vitro gereiften Oozyten von Schlachtovarien, weil diese in großer Zahl kostengünstig gewonnen werden können (First und Parrish, 1987).

Einem hohen Prozentsatz dieser Oozyten haftet aber der Mangel an, daß sie in herkömmlichen Inkubationssystemen nicht in der Lage sind die Fähigkeit für die Entwicklung zum Vorkern- und vom Vorkern- zum Blastozystenstadium zu erlangen (Thibault et al., 1975; Thibault, 1977; Moor und Trounsen, 1977; Leibfried-Rutledge et al., 1986a und 1987).

Es ist daher das Ziel aller Untersuchungen auf diesem Gebiet die Ursachen dieses Handikaps aufzudecken und die in vitro Reifung dahingehend zu optimieren, daß vollständig gereifte, physiologisch entwickelte, weibliche Gameten erzielt werden, die in der Lage sind fertilisiert zu werden und sich zu solchen Embryonalstadien zu entwickeln, die unblutig auf Empfängertiere übertragen werden können (Motlik und Fulka, 1986; First und Parrish, 1987).

2.2.3 Einflüsse

2.2.3.1 Oozyten

Die Qualität der Oozyten, d.h. ihre Fähigkeit zu reifen, variiert bei superovulierten Tieren von Spender zu Spender (Lambert et al., 1986).

Es ist bekannt, daß hierfür die Gonadotropinstimulation verantwortlich ist (Callesen et al., 1986; Moor et al., 1984). Schlachthofovarien stammen von Tieren unbekannter Herkunft und Vorgeschichte. Die große Heterogenität der Qualität dieser Oozyten beruht u.a. auf einer eventuellen Vorbehandlung der Rinder mit Gonadotropinen (Sterilitätstherapie), sowie auf individuellen Unterschieden in der Reifungsfähig-

keit der Oozyten der einzelnen Rinder (Pavlok, 1987 persönliche Mitteilung).

Die Fähigkeit der Rinderoozyten *in vitro* zu reifen steht in keinem Zusammenhang mit dem Zyklusstand des Spendertieres und der Größe des Follikels, von dem die Oozyte gewonnen wird, (Leibfried und First, 1979a; Fukui und Sakuma, 1980). Jedoch erwies sich das Erscheinungsbild von Kumulus und Zytoplasma als Selektionskriterium für eine erfolgreiche meiotische Reifung. Eine Oozyte hoher Qualität weist ein dunkles, gleichmäßig granuliertes Zytoplasma auf und besitzt eine vollständige, kompakte Umhüllung aus Kumuluszellen. Derartige Kumulusoozytenkomplexe werden vorrangig in nichtatretischen Follikeln mit einem Durchmesser kleiner als 6 mm gefunden (Leibfried et al., 1985; Süss und Stranzinger, 1987b). Oozyten für die *in vitro* Reifung werden deshalb im allgemeinen von 1-5 mm großen Follikeln gewonnen.

Die sorgfältige Überwachung der Temperatur bei Gewinnung und Transport von Ovarien und Oozyten ist sehr wichtig, da Oozyten, die unter 30°C abkühlen nicht mehr in der Lage sind über die Metaphase II hinaus zu reifen. Von mindestens ebenso fatalem Einfluß sind Temperaturschwankungen bei Transport und Verarbeitung der Oozyten (First und Parrish, 1987).

Obwohl die Zeitspanne zwischen Schlachtung und Oozytengewinnung keinen Einfluß auf die Kernreifung zu haben scheint (Shea et al., 1976), wird angenommen, daß ein möglichst kurzes Intervall sich positiv auf die Erfolgsraten der IVM und IVM bzw. auf die Weiterentwicklungsfähigkeit der Oozyten auswirkt. Gerade diese frühe Periode ist kritisch für den nachfolgenden OMED *in vitro* (Xu et al., 1987a; Motlik et al., 1978).

2.2.3.2 Medien und Zusätze

Die Erfolgsraten der IVF von in vitro gereiften Oozyten hängen besonders von den verwendeten Reifungsmedien ab (Fukui et al., 1982).

Mehrere verschiedene Kulturmedien wurden erfolgreich für die IVM von Rinderoozyten verwendet. Dazu gehören: Medium 199 (Leibfried-Rutledge et al., 1987; Critser et al., 1986; Katska und Smorag, 1985), Hams F12 (Fukushima und Fukui, 1985) und TALP (Ball et al., 1983; Lenz et al., 1983a; Critser et al., 1984; Leibfried-Rutledge et al., 1986a) (First und Parrish, 1987).

Obwohl es bis jetzt kein völlig definiertes Medium für Kulturen von Wiederkaueroozyten gibt, weiß man, daß unter anderem die divalenten Kationen Kalzium und Magnesium notwendige Bestandteile von Reifungsmedien sind (Leibfried und First, 1979b und 1980; Jagiello et al., 1982; Maruska et al., 1984). Auch der pH und der osmotische Druck des Mediums können die Reifung beeinflussen. Oozyten reifen in Medien deren pH-Werte zwischen 6,70 und 7,59 schwanken (Shea et al., 1976). Üblicherweise werden Medien auf einen pH zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt, der den physiologischen Verhältnissen entspricht (Sato et al., 1978; Sato und Koide, 1987).

Reifungsmedien für Rinderoozyten sind meist isoton, der osmotische Druck beträgt ca. 290 mosmol (Thibault, 1977).

Von nicht zu unterschätzenden Einfluß auf den Erfolg der IVM ist die Frische der Medien (Greve et al., 1986), sowie die Reinheit der verwendeten Chemikalien und vor allem des destillierten Wassers (Pavlok, 1987 persönliche Mitteilung).

Das Prinzip der verschiedenen Oozytenkultursysteme ist die Nachahmung der in vivo Verhältnisse (Xu et al., 1987b). Dies spiegelt sich vor allem in den verschiedenen Medienzusätzen wieder.

Die Bedeutung des Follikels für die Reifung wurde schon angesprochen (s. 2.1.3.).

Die Abnormalitäten in der Fertilisierbarkeit und Weiterent-

wicklungsfähigkeit nach in vitro Kultur von Oozyten außerhalb des Follikels konnten durch die Reifung der Oozyten im intakten Follikel aufgehoben werden (Thibault und Gerard, 1973; Moor und Trounsen, 1977).

Daraus wurde geschlossen, daß Follikelzellen, Gonadotropine und Östrogen für die Reifung in vitro benötigt werden (Staig-miller und Moor, 1984).

Durch in vitro Kokultur unreifer Oozyten mit Granulosazellen oder Kumuluszellen in ausreichender Konzentration, unter Stimulation von Gonadotropinen (LH und FSH) und Östrogen (17- β -Östradiol) konnten nach IVF Blastozysten erzielt werden, womit bewiesen war, daß derart kultivierte Oozyten vollständig gereift waren und die Weiterentwicklungskapazität besitzen (Critser et al., 1986 und 1987; Lu et al., 1987a; Xu et al., 1987a).

Frühere Teilungsstadien können nicht als Maß für eine normale Reifung verwendet werden, da viele während der Kultur induzierten Abnormalitäten erst bei der Blastulation entdeckt werden können (Moor und Trounsen, 1977).

Steroide werden zwar nicht für die Auslösung der Meiose benötigt (Lindner et al., 1974; Thibault et al., 1975; Thibault, 1977), physiologische Steroidkonzentrationen und -muster, im Besonderen von 17- β -Östradiol, im Reifungsmedium sind essentiell für die vollständige, physiologische Reifung der Oozyte und Erlangung der Entwicklungsfähigkeit (Moor und Warnes, 1978; Moor und Trounsen, 1977; Staig-miller und Moor, 1984; Xu et al., 1987b).

Auch Gonadotropine haben in vitro einen positiven Einfluß auf die physiologische Reifung.

Die Zugabe von LH zum Reifungsmedium hat zwar kaum einen Einfluß auf die Vollendung der Kernreifung (Beschleunigung des GVBD, Kaplan et al., 1978), jedoch verbessert es die Fertilisierbarkeit, und unterstützt in Kombination mit FSH und Östrogen, die normale Entwicklung von in vitro kultivierten extrafollikularen Rinderoozyten. Gonadotropine und Östrogen wirken hierbei synergistisch (Shalgi et al., 1979; Moor

und Trounsen, 1977; Fukushima und Fukui, 1985).

FSH lost neben anderen Substanzen (cAMP, dbcAMP, Phosphodiesterasehemmer, Choleratoxin) in vitro die Kumulusexpansion aus (Eppig, 1979; Ball et al., 1983); allerdings nur in der Gegenwart von fetalem Kalberserum (FKS) (Eppig, 1980b). Die optimale Konzentration von FSH zur Auslösung der Kumulusexpansion ist $1 \mu\text{g/ml}$ (Hensleigh und Hunter, 1983 und 1985).

Es wird angenommen, daß die Kumulusexpansion begleitend zur Zytoplasmareifung stattfindet (Suss und Stranzinger, 1987b). Ein weiterer Grund für die bedeutende Rolle der Follikelzellen bei der Reifung, mag auch in ihrer Fähigkeit zur Produktion von Pyruvat als Energiesubstrat für die reifenden Oozyten liegen (Ball et al., 1984).

In der Gegenwart von Kumuluszellen wirken sich Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat und Oxalacetat günstig auf die Reifung aus, d.h. diese Energiequellen können bei Anwesenheit von Follikelzellen während der Reifung in vitro verwertet werden (Sato et al., 1977).

Viele Reifungsmedien enthalten deshalb Glukose als Energielieferant und einigen wird außerdem Pyruvat zugesetzt (Bavister und Yanagimachi, 1977; Critser et al., 1986; Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Für die vollständige Entwicklung und nachfolgende Fertilisation muß das Reifungsmedium Blutserum oder Serumextrakte enthalten (First und Parrish, 1987).

Bei der Kultur von Rinderoozyten sind Vollseren, wie FKS, Albuminzubereitungen, wie BSA (Bovines Serum Albumin), überlegen. FKS ist für die FSH-induzierte Kumulusexpansion nötig und verbessert die Lebensfähigkeit und Vollendung der ersten meiotischen Teilung im Vergleich zu BSA (Leibfried-Rutledge et al., 1986b).

In jüngsten Berichten wird dem Serum von brunstigen Kühen, als Proteinzusatz zu Reifungsmedien der Vorzug vor FKS gegeben. Es bewirkt eine vollständige Expansion des Kumulus, einschließlich der Korona radiata, sowie höhere Fertilisations- und Entwicklungsraten im Vergleich zu FKS und Rinder-

seren, die an anderen Zyklustagen gewonnen wurden (Sanbuissho und Threlfall, 1985, 1988; Xu et al., 1987a; Lu et al., 1987a,b).

2.2.3.3 Inkubationssysteme

Die Kernreifung von Oozyten ist nicht sehr temperaturempfindlich. Rinderoozyten reifen zwischen 35°C und 41°C.

Über die optimale Reifungstemperatur herrschen aber unterschiedliche Auffassungen. Lenz et al. (1983a) erzielten die besten Fertilisationsergebnisse nach Oozytenkultur bei einer Inkubationstemperatur von 39°C, in Anlehnung an die Kerntemperatur des Rindes. Dahingegen zeigten Katska und Smorag (1985), daß Oozyten, die zwischen 35°C und 39°C gereift wurden Zytoplasma höherer Qualität (3'6'-Fluorescein Diacetat - FDA-Test) besitzen und häufiger befruchtet werden, als jene, die bei 39°C gereift werden.

Erfolgreiche in vitro Reifung wird heute bei 37°C, 38°C und 39°C durchgeführt (Critser et al., 1986; Xu et al., 1987a; Lu et al., 1987a,b).

Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen, daß die meisten Oozyten einer Population die Metaphase II in vitro nach 18 bis 30 Stunden Kulturdauer erreichen, je nach Kulturbedingungen, Ansetzen des Kulturbeginns und Definition der Reifungsstadien (Süss und Wüthrich, 1985; Hyttel et al., 1986a,b; Sato et al., 1978).

Eine Kulturdauer von 24 Stunden erwies sich als ausreichend, da auch eine Verlängerung auf mehr als 28 Stunden (Shea et al., 1976), auf 33 Stunden (Kanagawa et al., 1986) bzw. auf 48 oder 72 Stunden (Trousens et al., 1977) keinen wesentlichen Anstieg der Reifungsrate ergab.

Die Gaszusammensetzung der Umgebung hat nur insofern einen Einfluß auf die Reifung, als bei bikarbonatgepufferten Medien ein entsprechender CO₂-Zusatz zur Reifungsatmosphäre zur Äquilibrierung des pHs im Medium benötigt wird.

Besondere Gasmischungen, wie z.B. Reduzierung des Sauerstoffpartialdruckes und/oder 90% Stickstoff, brachten keine entscheidenden Vorteile für die Reifung (Trousens et al., 1977). Die in den meisten Studien verwendete Gasatmosphäre besteht aus 5% CO₂ in Luft bei maximaler Feuchtigkeit.

Auf die Bedeutung der Steroide und Follikelzellen für die Reifung wurde schon hingewiesen (s. 2.2.3.2).

Ein wichtiges zusätzliches Element für die Aufrechterhaltung eines korrekten Steroidgleichgewichts im Medium, bzw. im Kokulturmedium ist die Verwendung eines nichtstatischen Kultursystems, besonders in der frühen Phase der Reifung.

Die Steroidzusammensetzung im nichtstatischen System ähnelt derjenigen in der Follikelflüssigkeit präovulatorischer Follikel, mit anfanglich hohem Östrogenspiegel und geringer Progesteronproduktion. In der zweiten Hälfte der Reifung wird dieses Verhältnis zugunsten von Progesteron umgekehrt (Staigmilller und Moor, 1984).

Das statische Kultursystem begünstigt das Anwachsen und damit die Luteinisierung der Follikelzellen, so daß Oozyten, die statisch auf Granulosamonolayern kultiviert werden, schon in frühen Phasen der Reifung hohen Progesteronspiegeln ausgesetzt sind, was einen negativen Einfluß auf die Reifung hat (Lutterbach et al., 1987; Staigmilller und Moor, 1984).

Dementsprechend konnten in einem nichtstatischen Inkubationssystem höhere Raten von übertragbaren Embryonen erzielt werden, als in einem gleichzeitig erprobten statischen System (Lu et al., 1987a).

Schließlich kann auch die Ölbedeckung von Mikrotropfenkulturen (Brinster, 1963) einen Einfluß auf die Medienzusammensetzung und damit auf die Reifung haben. Die Konzentrationen von Proteinen, Aminosäuren, Energiesubstraten und Ionen bleiben im Mikrotropfen konstant. Jedoch lipophile Substanzen, wie Steroide, Serumbestandteile oder undefinierte Lipide aus BSA-Zubereitungen diffundieren in die Ölüberschichtung und werden somit dem Medium entzogen. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die Östrogenkonzentration in Mikrotropfen innerhalb von 24

Stunden um über 50% abnahm. Dabei ist es gleichgültig, ob die Ölbeschichtung aus Paraffin- oder Siliconöl besteht (Miller und Pursel, 1987; Xu et al., 1987b).

Demgegenüber stehen die Vorteile der Mikrotropfenkultur, wie Verminderung der Verdunstung aus den Mikrotropfen, Schutz vor mikrobieller Kontamination, Ausgleich von Temperatur- und Gasschwankungen sowie Erleichterung der Beobachtung während der Kultur (Miller und Pursel, 1987).

2.3 Die Fertilisation von Rinderoozyten in vivo

Die Fertilisation oder Befruchtung beinhaltet eine Reihe von komplexen zellulären und molekularen Ereignissen, deren Ergebnis die Vereinigung der beiden haploiden Chromosomensätze der weiblichen und männlichen Gameten ist (Wheeler und Seidel, 1987).

Bei der normalen Befruchtung dringt ein einziges Spermium in das Ooplasma ein und aktiviert die Oozyte (Meinecke-Tillmann und Meinecke, 1980; Pomeroy und Seidel, 1985).

Ohne die Aktivierung durch die Samenzelle beginnt die Oozyte normalerweise nicht sich zu teilen, und somit erfolgt auch keine embryonale Entwicklung. Die Fertilisation ist also ein dualer Prozeß (Kanagawa et al., 1987), bei dem beide Gameten beteiligt sind.

Bis es zur Teilung kommt, laufen vor und während der Fertilisation an beiden Gameten unterschiedliche Vorgänge und Veränderungen ab, die jedoch in enger Beziehung zueinander stehen (Ball et al., 1984).

2.3.1 Die Kapazitation und Akrosomreaktion

Säugetierspermien sind nicht sofort in der Lage Eizellen zu befruchten. Sie müssen sich erst eine bestimmte Zeit im weiblichen Genitaltrakt aufhalten und sich dort einer Reifung

oder Vorbereitungsperiode unterziehen, die Kapazitation genannt wird (First und Parrish, 1987; Byrd, 1981).

Dieses Phänomen, das zuerst 1951 von Chang und Austin beschrieben wurde, verleiht den Spermien die Fähigkeit die Akrosomreaktion zu vollziehen, eine hyperaktive Motilität zu entwickeln und mit dem Oolemm zu verschmelzen.

Die Kapazitation ist vermutlich kein Einzelereignis, sondern eine Reihe von funktionellen Veränderungen des Spermiums, die es in die Lage versetzen bestimmte Veränderungen (Akrosomreaktion) zu vollziehen, so daß die Fusion von Spermium und Oozyte stattfinden kann (Bedford, 1983).

Die Substanzen, die die Kapazitation auslösen, und deren Ursprung und Wirkungsort im weiblichen Genitale sind weitgehend unbekannt (First und Parrish, 1987; Bedford, 1983).

Der endokrine Status des weiblichen Tieres kann die Fähigkeit des Geschlechtstraktes Spermien zu kapazitieren beeinflussen (Herz et al., 1985).

Die Eileiterflüssigkeit aus dem follikularen Stadium des Zyklusses (Proostrus-Östrus) ist offensichtlich in der Lage die Kapazitation zu verursachen, nicht dagegen jene aus der Lutealphase (Lee et al., 1986).

Ostrogen stimuliert die Kapazitation von Spermien im Uterus von Kaninchen, und Progesteron unterdrückt sie (Bedford, 1974). Auch die Fähigkeit des Ovidukts die Kapazitation zu fordern wird beim Hamster durch Progesteron verhindert (Viriyapanich und Bedford, 1981).

Der Versuch das kapazitierende Agens in der Eileiterflüssigkeit zu isolieren zeigte, daß ein heparinähnliches Glykosaminoglykan (hGAG) für die kapazitierende Aktivität der Eileiterflüssigkeit von Kühen im Östrus verantwortlich ist, das jedoch bis jetzt noch nicht als Heparin oder Heparansulfat identifiziert werden konnte (First und Parrish, 1987).

Glykosaminoglykane werden im ganzen weiblichen Genitaltrakt, einschließlich des Follikels gefunden (Lee und Ax, 1984), und ihre Produktion wird durch Steroidhormone reguliert (Zachariae und Thorsoe, 1966).

Der Ort der Fertilisation ist bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren der untere Teil der Ampulle des Eileiters am Übergang zum Isthmus (Kanagawa et al., 1986). Dorthin wandern die Spermien nur zum Zeitpunkt der Ovulation. Zuvor bleiben sie im Isthmus des Ovidukts, dem Spermienreservoir des Rindes. Für die Fertilisation ausreichende Zahlen von Spermien benötigen 6-12 Stunden bis sie in den Isthmus gelangen und wenn sie am Anfang des Ostrus im weiblichen Genitale abgesetzt wurden können sie 18-24 Stunden im Isthmus verbleiben, bis es zur Befruchtung kommt (Hunter und Wilmut, 1984).

Durch diese Wanderungen der Spermien wird die Bestimmung des Ortes der Kapasitation kompliziert (First und Parrish, 1987). Die Kapasitation kann im Uterus stattfinden, wird aber durch einen anschließenden Aufenthalt der Spermien im Eileiter beschleunigt (Bedford, 1969a).

Ob Spermatozoen, wenn sie den Eileiter erreichen normalerweise schon kapazitiert sind ist nicht bekannt. In Anbetracht der langen Zeit, die die Spermien im unteren Isthmus verbringen, ist es jedoch wahrscheinlich, daß die Kapasitation im Eileiter vollendet wird (First und Parrish, 1987).

Beim Rind konnte gezeigt werden, daß die Akrosomreaktion fast ausschließlich in der Ampulle des Ovidukts, das auf der gleichen Seite wie das ovulierende Ovar liegt, stattfindet, und zwar nur kurz vor oder kurz nach der Ovulation (Henz et al., 1985). Daraus folgt, daß die Kapasitation vorzugsweise im ipsilateral zur Ovulation liegenden Eileiter stattfindet (First und Parrish, 1987).

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß bei der Ovulation aus dem Follikel freigesetzte Glykosaminoglykane (GAGs), die von Granulosazellen stammen, die Kapasitation bzw. Akrosomreaktion bewirken. Ebenso können aber auch GAGs aus dem Ovidukt oder von Kumulustellen dafür verantwortlich sein (Henz et al., 1985; Lenz et al., 1983b).

Im Gegensatz zur Kapasitation (Bedford, 1969b) können der Akrosomreaktion charakteristische, morphologische Veränderungen zugeordnet werden: Die Plasma- und äußere Akrosommembran

verschmelzen punktförmig an vielen Stellen, so daß eine fenestrierte Hülle aus Membranvesikeln die Spitze des Spermienkopfes umgibt (Vesikulation). In den Verschmelzungspunkten entstehen Poren, durch die die akrosomalen Enzyme austreten können (Langman, 1980; Bedford, 1983). Von diesen spielen Hyaluronidase und CPE (corona penetrating enzyme) eine Rolle beim Durchdringen der Kumuluszellen. Der Verlust der Akrosomenkappe, beim Eindringen in die Zona pellucida, stellt die Vollendung der Akrosomreaktion dar. Hierdurch wird die innere Akrosommembran frei, die an ihrer Spitze das sog. Perforatorium bildet (Kanagawa et al., 1986).

Spermien in der Nähe der Zona pellucida, aber ohne direkten Kontakt mit ihr, haben intakte Akrosome, während alle Spermien, die die Zona durchdringen die Akrosomreaktion vollendet haben. Beim Rind findet die Akrosomreaktion also an der Oberfläche der Zona pellucida statt (Crozet, 1984).

Das Durchdringen der Zona wird durch die Enzyme TLE (trypsin like enzyme) und Akrosin, das vermutlich an die innere Akrosommembran gebunden bleibt, unterstützt (Rogers, 1981; Kanagawa et al., 1986).

Weitere akrosomale Enzyme sind: Proteinase, Esterase, Neuraminidase, Saure Phosphatase, Phospholipase, Arylsulfatase, β -N-Acetylglucosaminidase und Kollagenase (Yanagisachi, 1981).

2.3.2 Biochemie von Kapazitation und Akrosomreaktion

Die genauen molekularen Vorgänge von Kapazitation und Akrosomreaktion sind nicht geklärt (First und Parrish, 1987).

Man vermutet, daß für die Kapazitation die (enzymatische ?) Entfernung von makromolekularem Material, das im männlichen Reproduktionstrakt die Spermien normalerweise umgibt, von der Spermienoberfläche nötig ist. Dieses Material stammt aus der Seminalplasma, da kapazitiertes Spermä, das Seminalplasma ausgesetzt wird, dekapazitiert wird. Dies geschieht vermutlich durch die Wiederherstellung der Oberflächenschicht oder

eines Dekapazitationsfaktors, dessen Identität unbekannt ist (Kanagawa et al., 1986; Lenz et al., 1983b).

Langlais und Roberts (1985) entwickelten ein Membranmodell, das auf molekularer Ebene die Veränderungen beschreibt, die mit der Kapazitation und Akrosomreaktion einhergehen.

Kapazitation ist demnach ein reversibles Phänomen, das bei seiner Vollendung zu einer Erniedrigung des negativen Membranpotentials, einem Ausstrom von Membrancholesterol, und damit zu einem Einstrom von Kalzium zwischen die Plasma- und äußere Akrosommembran führt. Ausgelöst durch den Einstrom von Kalzium wird Phospholipase-A₂ aktiviert, die die Synthese und vorübergehende Akkumulation von ungesättigten Fettsäuren und fusogenen Lysophospholipiden katalysiert. Dadurch kommt es zur Membranfusion und Vesikelbildung, die die Charakteristika der Akrosomreaktion sind.

Der kritische Schritt dieses Modells ist der Ausstrom von Cholesterol, der das Sterol-Phospholipidverhältnis der Membran verändert. Sobald dieser Schritt vollzogen ist laufen die folgenden kaskadenartig ab (Langlais und Roberts, 1985). Die Rolle von hGAGs aus der Eileiterflüssigkeit bei der Kapazitation von bovinem Sperma wird bei diesem Modell jedoch nicht berücksichtigt, obwohl ein hGAG unter physiologischen Bedingungen essentiell für eine effektive Kapazitation von ejakulierten bovinen Spermien ist (Parrish et al., 1985a,b und 1986).

Aufbauend auf den bekannten Effekten von Heparin auf Spermien und andere Zelltypen schlugen First und Parrish (1987) mehrere mögliche Rollen vor, die ein hGAG aus dem Eileiter beim Molekularen Membranmodell nach Langlais und Roberts (1985) während der Kapazitation spielen könnte.

hGAGs konnten auf zwei Wegen eine Modifikation der Plasmamembran des Spermiums bewirken, die dann den ersten Schritt für die von Langlais und Roberts vorgeschlagenen Veränderungen darstellen wurde. Zum einen könnten sie ein Dekapazitationsprotein (Oliphant et al., 1985) von der Spermienoberfläche verdrängen, und zum anderen direkt auf den Membranaufbau

Einfluß nehmen, indem sie Bewegungen von Membranbausteinen verhindern oder verursachen.

Des weiteren konnten hGAGs direkt die Kalziumaufnahme in die Spermien während der Kapazitation steigern, und schließlich indirekt Phospholipase-A₂ aktivieren, um dadurch die Kapazitation bzw. die Akrosomreaktion im Sinne des Molekularen Membranmodells zu beeinflussen (First und Parrish, 1987).

Ein zusätzlicher Effekt von hGAGs auf die Kapazitation ist vermutlich die Aktivierung einer cAMP abhängigen Proteinkinase. 8-bromo-cAMP hebt in vitro die Hemmung der heparininduzierten Kapazitation durch Glukose auf, aber 8-bromo-cAMP selbst ist nicht in der Lage Spermien zu kapazitieren (Cusko-Parrish et al., 1985).

2.3.3 Penetration, Aktivierung und Fusion

Um in die Oozyte zu gelangen muß das Spermatozoon zuerst den Kumulus, dann die Zona und schließlich das Oolemma durchdringen (Kanagawa et al., 1986).

Die ovulierte Oozyte ist von expandierten Kumulusmassen umgeben, deren mukose Zwischensubstanz aus Hyaluronsäure besteht (Ball et al., 1983). Eine Rolle der Hyaluronsäure im Kumuluskomplex ist die Identifikation und der Transport des Kumulusoozytenkomplexes durch die Fibrillen des Eileiters (Mahi-Brown und Yanagimachi, 1983).

Neben ihrem positiven Einfluß auf Kapazitation und Fertilisationsrate (Ball et al., 1983), üben Kumuluszellen eine chemotaktische Anziehung auf Spermien aus (Crozet, 1984).

In der Anwesenheit von Koronaradiatazellen dringen mehr Spermien in die Zonae der Oozyten ein, als in deren Abwesenheit (Crozet, 1984).

Auf der Zona pellucida befinden sich Spermienrezeptoren. Die entsprechenden Bindungsstellen der Spermien sitzen beim Fink vermutlich auf der Plasmamembran, so daß die Anlagerung der Spermien an die Zona noch vor der Vervollendung der Akrosomreaktion

tion an der Zonaoberfläche erfolgt (Crozet, 1984).

Die befruchtungsfähigen Spermien durchdringen die Zona tangential auf einem mehr oder weniger gewundenen Weg (Crozet, 1984; Hyttel et al., 1988).

An der Innenseite der Zona wirkt der Block gegen Polyspermie (Zonareaktion), so daß nur ein Spermium den Perivitellinen Raum erreicht (Crozet, 1984).

Sobald das Spermium die Oberfläche der Oozyte berührt, wird diese aktiviert, die zweite Reifeteilung vollendet, der Zonablock ausgelöst und die kortikalen Granula entleert (Langman, 1980).

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Mikrovilli auf der Oozytenmembran aktiv an der Verschmelzung von Spermium und Oozyte beteiligt sind. Sie nehmen Kontakt mit dem Spermienkopf auf, der flach auf der Oozyte liegt, und verteilen sich dann über dessen postakrosomale Region und über das äquatoriale Segment. Die Fusion mit der Oozyte beginnt am äquatorialen Segment und breitet sich auf die postakrosomale Region aus (Flechon und Pavlok, 1986). Durch diese Vorgänge gelangen Spermienkopf und -schwanz, der später degeneriert, in die Eizelle (Kanagawa et al., 1986). Im Ooplasma dekondensiert der Spermienkern bald, und seine Kernmembran verschwindet völlig.

Etwa zur gleichen Zeit ist das weibliche Chromatin meist schon kompaktiert, und die Membran des weiblichen Vorkerns wird gebildet. Auch die Exozytose der kortikalen Granula hat zu diesem Zeitpunkt (2-3 Stunden nach der Ovulation) schon stattgefunden (Crozet, 1984; Hyttel et al., 1988).

Nachdem beide Vorkerne ausgebildet sind (5-7 h p. ov.) wandern sie aufeinander zu und nehmen eine zentrale Position ein. Noch vor der Verschmelzung der beiden haploiden Vorkerne (Synkaryosis), wird ihre DNA redupliziert; die parentalen Chromosomen werden während der Synkaryose nicht gemischt. Nach der Fusion (ab 19 h p. ov.) folgen mitotische Teilungen, womit die embryonale Entwicklung beginnt (Xu, 1987; Hyttel et al., 1988).

2.4 Die Fertilisation von Rinderoozyten in vitro

2.4.1 Geschichte

Die Ergebnisse der ersten Versuche Rinderoozyten, in einer Vielzahl von Medien und Kulturbedingungen, ausschließlich in vitro zu fertilisieren, waren wenig ermutigend (Sreenan, 1970; Bregulla et al., 1974; Baker und Polge, 1976; Iritani und Niwa, 1977).

Eingehende Untersuchungen der morphologischen und physiologischen Grundlagen der Fertilisation und frühen Entwicklung des Rindes, führten am 9. Juni 1981 zur Geburt des ersten Kalbes nach IVF (Brackett et al., 1982).

Heute wird IVF erfolgreich bei fast 20 Tierarten durchgeführt (zur Übersicht s. Brackett, 1983), darunter bei den drei Hauswiederkäuern Rind, Schaf und Ziege.

Die Entwicklung der IVF beim Rind ist weitgehend dem Fortschritt der letzten fünf Jahre zu verdanken, und noch in keiner Weise perfekt (Ball et al., 1984).

Bis jetzt wurden mehr als zehn Kälber nach IVF von in vivo gereiften Oozyten geboren (Brackett et al., 1982, 1984; Sirard et al., 1985 bzw. Lambert et al., 1986), und es gibt zahlreiche Berichte über die erfolgreiche IVF (höhere Embryonalstadien / Trächtigkeiten) beim Rind (Bondioli und Wright, 1983; Greve et al., 1984; Sirard und Lambert, 1985; Greve et al., 1986; Parrish et al., 1986; Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Allerdings entwickeln sich nur wenig mehr als 10% der wiedergewonnenen Oozyten zu lebenden Nachkommen; das entspricht einer geringeren Effektivität als unter natürlichen Bedingungen (First und Parrish, 1987).

Auf die geglückte IVF nach IVM von Rinderoozyten wurde schon hingewiesen (s. 2.2.1.).

2.4.2 Zielsetzung

Bei den Säugetieren findet die Befruchtung in der geschützten und gut kontrollierten Umgebung des Eileiters statt.

Bei der IVF werden (physiologisch) gereifte weibliche und männliche Gameten in einem Nährmedium zusammengebracht, das befriedigende Bedingungen für den Ablauf von Penetration, Fertilisation und evtl. auch Teilung bieten soll (Xu, 1987). Noch werden nicht alle Einzelheiten der in vivo Fertilisation verstanden, worin die Schwierigkeit liegt ein erfolgreiches in vitro Fertilisationssystem zu entwickeln.

Im allgemeinen versuchen Forscher, bei der IVF, die Abfolge der natürlichen Ereignisse nachzuahmen (Ball et al., 1984), und dabei die grundlegenden Prozesse der Fortpflanzung besser verstehen zu lernen (Xu, 1987).

Dennoch sind die einzelnen Grundschritte einer erfolgreichen IVF nicht hinreichend gut definiert (Xu, 1987).

Der Erfolg der IVF hängt von der Vollendung der Oozytenreifung und Spermienkapazitation, sowie von jedem Detail des in vitro Fertilisationssystems ab. Jeder einzelne Schritt kann das Endresultat beeinflussen (First und Parrish, 1987; Xu, 1987).

Wenn IVF nicht als Mittel zur Erforschung der Kapazitation oder vielleicht als Fruchtbarkeitsindikator benutzt wird, ist das beabsichtigte Ergebnis ein lebensfähiger Embryo.

Dieser bildet die Grundlage für die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der IVF in der Grundlagenforschung und v.a. den modernen Züchtungstechniken (First und Parrish, 1987).

2.4.3 Einflüsse

2.4.3.1 Kapazitationsmethoden

Vor allem in frühen Studien wurden Rinderspermien in heterologen (Schaf, Schwein, Kaninchen) und homologen (Rind) Eilei-

tern und Uteri kapazitiert, da anfangs noch keine in vitro Kapazitationsmethoden zur Verfügung standen (Sreenan, 1970; Shea, 1973; Bregulla et al., 1974; Bedirian et al., 1975; Shea, 1976; Iritani und Niwa, 1977; Trounsen et al., 1977; Meinecke und Meinecke-Tillman, 1979; Fukui et al., 1983b; Iritani et al., 1984).

Durch Inkubation der Spermien in Serum und Follikelflüssigkeit konnte Sperma in vitro kapazitiert werden (Bregulla et al., 1974; Breuer und Wells, 1977; Fukui et al., 1983a).

Die verschiedenen in vitro Kapazitationsmethoden für Wiederkauerspermien basieren in erster Linie auf Modifikationen von Techniken, die sich für Nagerspermien bewährt haben, da diese Tierart die am besten erforschte in Bezug auf Spermienkapazitation ist. Obwohl die Ergebnisse der Kapazitationsstudien von Nagersperma nicht ohne weiteres auf Rindersperma übertragen werden können, wurden mehrere Kapazitationsmethoden für Rinderspermien auf dieser Grundlage entwickelt (First und Parrish, 1987).

Katecholamine (Epinephrin), β -Aminosäuren (Hypotaurin, Taurin) und Serumalbumine kommen natürlicherweise im Eileiter vor und fördern die Fertilisation in vitro (Leibfried und Bavister, 1982).

Es wurde gezeigt, daß Hypotaurin und Epinephrin in einer Salzlösung mit Serumalbuminen und Energiesubstraten die Kapazitation von Hamsterspermatozoen bewirken (Leibfried und Bavister, 1981, 1982).

Die Zugabe von Hypotaurin und Epinephrin zum Fertilisationsmedium bei IVF von Rinderoozyten hatte einen positiven Einfluß auf die Fertilisation. Zwar erhöhten sich die Fertilisationsraten nicht signifikant, jedoch die Häufigkeit der Oozyten mit zwei Pronuklei (Ball et al., 1983).

Iritani (1987) und Utsumi et al. (1988) verwenden eine IVF Routinemethode, bei der Rindersperma durch 6-8 stündige Präinkubation in einer modifizierten Tyrodelösung, die Hypotaurin enthält, kapazitiert wird.

Hypertone (380 mosmol), definierte Medien, wie HIS (high

ionic strength solution) werden erfolgreich für die in vitro Kapazitation von Rinderspermien eingesetzt (Brackett et al., 1982, 1984; Lambert et al., 1986; Kauffold et al., 1988). Sie sollen Proteine, die die Kapazitation verhindern, von der Spermienoberfläche verdrängen.

Isootone (290 mosmol), definierte Medien (modifizierte Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung, mKRS) eignen sich, bei einer optimalen Präinkubationszeit von 8 Stunden, ebenfalls zur Kapazitation von Rindersperma (Iritani et al., 1984).

Auch eine langdauernde Präinkubation der Spermien bis zu 30 Stunden in modifiziertem Tyrode's Medium (TALP, Ball et al., 1983), die den Oberflächenproteinen die nötige Zeit zur Dissoziation läßt, erwies sich als effektiv (Wheeler und Seidel, 1986), ebenso wie der Zusatz von Kalziumionophoren, wie A23187 (Byrd, 1981) oder Ionomycin (Ball et al., 1983) zum Fertilisationsmedium. Sie lösen durch direkte Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels die Akrosomreaktion aus. Die GAGs Heparin, Chondroitinsulfat A, B oder C und Hyaluronsäure können die Kapazitation und Akrosomreaktion in vitro auslösen (Lenz et al., 1982, 1983b; Handrow et al., 1982; Parrish et al., 1985a).

Die Potenz hängt vom Grad der Sulfatierung ab, und Heparin ist das wirksamste GAG (Handrow et al., 1982).

Die Wirkung von GAGs wird durch Glukose aufgehoben (Parrish et al., 1985a; Susko-Parrish, 1985; Miller und Hunter, 1986). Durch die Kapazitation von Rindersperma mit Heparin konnten hohe Fertilisationsraten erzielt werden (Parrish et al., 1985b, 1986).

Auf die möglichen Wirkungsmechanismen wurde schon eingegangen (s. 2.3.2), aber der genaue Mechanismus der Heparinwirkung auf Spermien bleibt noch zu erforschen (First und Parrish, 1987).

Möglicherweise ist auch die kapazitierende Wirkung einiger anderer genannter Methoden auf Heparin zurückzuführen, da die verwendeten Oozyten in heparinisierten Medien gewonnen wurden (Brackett et al., 1982; Fukui et al., 1983a; Lambert et al.,

1986), und das Heparin über die Korallusoozytenkomplexe in die Gametenkokultur gebracht wurde (First und Parrish, 1987).

Durch seine Wirkung als second messenger stimuliert cAMP die Motilität und den Metabolismus der Spermien. Dieselbe Wirkung besitzen Phosphodiesterasehemmer wie Koffein (Garbers et al., 1973), wobei nicht bewiesen ist, daß dies durch die koffein-induzierte Erhöhung des cAMP-Titers bewirkt wird (Schoff und Lardy, 1987).

Bezüglich des Einflusses von cAMP und/oder Koffein auf die IVF existieren widersprüchliche Aussagen (Ball und First, 1983; Critser et al., 1984; Goto et al., 1988).

Schließlich konnte kürzlich gezeigt werden, daß eine rasche Kapazitation und Akrosomreaktion durch Behandlung des Rinderspermias mit Lysophospholipiden (LPL) oder Trypsin bewirkt werden kann (Wheeler und Seidel, 1988), bzw. daß der Zusatz von LPL zum Präinkubationsmedium den Anteil der Embryonen, die sich zu Blastozysten entwickeln, erhöht (Chen et al., 1988).

2.4.3.2 Spermien

Hand in Hand mit den Kapazitationsmethoden gehen Techniken zur Spermaaufbereitung.

Waschen der Samenproben durch Verdünnung oder Zentrifugation, soll hemmende Komponenten entfernen und ganz allgemein die Kapazitation vorbereiten (Rogers, 1981).

Die Anreicherung motiler Spermien wird durch die sog. sperm-swimup-procedure (Parrish et al., 1986) oder durch Waschen in einer Percoll Dichtegradientenlösung (Iritani, 1987; Utomi et al., 1988) erreicht.

Das swimup Verfahren erhöht nicht nur den Anteil motiler und vorwärtsbeweglicher Spermien (Keefer et al., 1985; Parrish et al., 1984), sondern auch die Penetrations- (Suss et al., 1987) und Fertilisationsrate (Parrish et al., 1984).

Bei derartigen IVF-Systemen sind wenige Oozyten lange Zeit,

verhältnismäßig vielen, befruchtungsfähigen Spermien ausgesetzt, so daß die Wahrscheinlichkeit einer polyspermen Befruchtung steigt, und die Polyspermieblocks nicht genügend Zeit haben sich zu entwickeln. Bei wenig effektiven Kapazitationsverfahren ist die Polyspermie kein Problem, darum sollte besonders bei wirksamen Kapazitationssystemen, sowohl die Spermienkonzentration als auch die Koinkubationszeit von Spermien und Oozyten kontrolliert werden, um die Polyspermie-rate möglichst gering zu halten. Polyspermie ist eine der Hauptursachen für die Unfähigkeit von IVF-Systemen Zygoten zu liefern (First und Parrish, 1987).

In vivo beträgt das Spermien-Oozytenverhältnis zum Zeitpunkt der Befruchtung annähernd 1:1. Nur wenige überzählige Spermien konnten in der Nähe der Oozyte beobachtet werden (Crozet, 1984).

Allerdings ist es bisher nicht möglich in Rinder-IVF-Systemen mit physiologischen Spermien-Oozytenverhältnissen zu arbeiten, da es bis jetzt noch nicht einmal ein Kulturmedium gibt, das Spermien, bei einem Spermien-Oozytenverhältnis von 10:1, genügend lange lebensfähig erhält (First und Parrish, 1987). Die übliche Spermienkonzentration beträgt bei IVF-Systemen von Wiederkäuern ca. $0,5-5,0 \times 10^6/\text{ml}$ (Xu, 1987), was einem Spermien-Oozytenverhältnis von 10.000-20.000:1 entspricht (Brackett et al., 1982; Parrish et al., 1985a, 1986; Lambert et al., 1986; Critser et al., 1986; u.a.m.).

Fertilisationsmedien sind im allgemeinen Modifikationen von Reifungsmedien (z.B.: Brackett und Oliphant, 1975: DM, defined medium; Ball et al., 1983: m-TALP, modified Tyrode Albumin Lactate Pyruvate medium), und ihre Zusammensetzung und Zusätze können den Erfolg der IVF beeinflussen (First und Parrish, 1987).

Bessere Fertilisationsergebnisse konnten bei Verwendung von bikarbonat- (TALP), anstelle von hepesgepufferten (TCM 199) Medien erzielt werden (Süss et al., 1987), und TCM 199 lieferte, in einer vergleichenden Untersuchung, bessere Ergebnisse als DM (Kauffold et al., 1988).

Pyruvat erwies sich als die wichtigste exogene Energiequelle für Spermienmotilität und Akrosomreaktion, aber auch Glukose und Laktat können verwertet werden (Bavister und Yanagimachi, 1977). Hierbei muß darauf geachtet werden, daß die kapazitierende Wirkung heparinisierten Medien durch Glukose blockiert wird (Parrish et al., 1985a; Susko-Parrish et al., 1985).

Der Einfluß der verschiedenen Serum- und Hormonzusätze auf die Fertilisation wurde schon besprochen (s. 2.2.3.2).

Ergänzend sei darauf hingewiesen, daß bei Verwendung von FKS, als Proteinquelle, die Polyspermierate erhöht war (Leibfried-Rutledge et al., 1986b).

Trotz unterschiedlicher Auffassungen über die Auswirkungen der Reifungstemperatur auf die IVF (s. 2.2.3.3), steht fest, daß die Fertilisation temperaturempfindlich ist, und höchste Fertilisationsraten bei einer Fertilisationstemperatur von 39°C erzielt werden. Es wird angenommen, daß Spermien bei Temperaturen unter 39°C nicht in der Lage sind die Akrosomreaktion physiologisch zu vollziehen (Lenz et al., 1983a).

In vivo ist bei allen Tierarten ejakuliertes Spermium für die Befruchtung verantwortlich (First und Parrish, 1987).

Bei der IVF dienen ejakuliertes - frisches und Tiefgefrierspermium (TG-Spermium) -, sowie epididymales Spermium, als Spermiumquelle.

Sowohl ejakuliertes, als auch epididymales Spermium ist für IVF geeignet (Ball et al., 1984), allerdings existieren Unterschiede in der Kapazitationsfähigkeit (First und Parrish, 1987). Ejakuliertes Spermium scheint mehr hemmende Komponenten auf seiner Oberfläche zu haben, als epididymales Spermium (Rogers, 1981). Bovines epididymales Spermium kann in einfachen Salzlösungen kapazitieren (Ball et al., 1983), aber ejakuliertes Spermium kapazitiert nur bei Zugabe von kapazitierenden Agentien (Parrish et al., 1985b, 1986).

Frisches Ejakulat benötigt eine längere Kapazitationszeit, als TG-Spermium, und dieses verliert schneller an Qualität als ungefrorener Samen (Wheeler und Seidel, 1986).

Auch bei Optimierung der IVF-Bedingungen, unter Beachtung all

der genannten Einflußmöglichkeiten, bleiben individuelle Unterschiede in der Einsatzmöglichkeit von verschiedenen Bullen für IVF bestehen (First und Parrish, 1987).

In zahlreichen Publikationen werden diese "Bullenunterschiede" beschrieben (Brackett et al., 1982; Greve et al., 1984; Sirard und Lambert, 1985; Hensleigh und Hunter, 1985; Hanada et al., 1985; Parrish et al., 1986; Kanagawa et al., 1986; Iritani et al., 1986; Graham et al., 1987; Le Guienne et al., 1987), und auch bei Schafbocken wird von diesen individuellen Unterschieden in der Fertilisationsfähigkeit in vitro berichtet (Fukui et al., 1988).

Die Bullenunterschiede sind besonders ausgeprägt bei der HIS Kapazitationsmethode (Brackett et al., 1982; Sirard und Lambert, 1985), während sie bei der Heparinmethode durch Veränderung der Heparindosis ausgeglichen werden können (Parrish et al., 1986).

Die Annahme, daß IVF als Test für die in vivo Fertilität von Bullen verwendet werden kann (Parrish et al., 1985c; First und Parrish, 1987; Bousquet und Brackett, 1982), steht in Widerspruch zu den Ergebnissen von Xu (1987), die zeigten, daß die Spermien bestimmter Bullen, die hohe Non-return Raten haben, nicht oder nur kaum in der Lage waren in vitro Eizellen zu penetrieren.

Iritani et al. (1986) nahmen an, daß die Bullenunterschiede von der Jahreszeit, dem Alter des Bullen, der Spermienqualität und der Zahl der Ejakulationen abhängen.

Nach Ausschluß all dieser Ursachen, führten Fukui et al. (1988) das Phänomen auf Variationen, entweder der Zusammensetzung des Seminalplasmas, oder des Verhältnisses von Seminalplasma und Spermienzahl zurück.

2.4.3.3 Oozyten

Nur korrekt gereifte Oozyten können in vitro erfolgreich fertilisiert werden. Deshalb sind Kern-, Zytoplasma- und

Kumuluszellreifung des Kumulusoozytenkomplexes Voraussetzung für die IVF (First und Parrish, 1987).

Als Oozytenquellen für die IVF dienen in vivo gereifte folliculäre oder tubare Oozyten, oder in vitro gereifte Oozyten von Schlachtovarien.

Beide in vivo gereiften Oozytenarten haben die Reifung vollendet und entwickeln sich nach IVF zu normalen Embryonen (Brackett et al., 1982; Leibfried-Rutledge et al., 1987).

In vitro gereifte Oozyten erlangen eine physiologische Fertilisierbarkeit und Weiterentwicklungsfähigkeit nur in Kokultur mit Granulosa- oder Kumuluszellen unter der Stimulation von Gonadotropinen und Östrogen (Critser et al., 1986; Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Sowohl in vitro, als auch in vivo gereifte Oozyten sind von expandierten Kumuluszellen umgeben (Eppig und Schroeder, 1986), die als Zeichen der zytoplasmatischen Reifung gewertet werden (Süss und Stranzinger, 1987b).

Im allgemeinen wird der Kumulus für die IVF intakt gelassen, da seine Anwesenheit die Spermienkapazitation und Fertilisationsraten steigert (Ball et al., 1983).

Große Kumulusmassen behindern aber den Kontakt des Spermatozoons mit dem Ei und verzögern die Befruchtung (Xu, 1987). Eine teilweise Entfernung der Kumuluszellen vor der IVF erleichtert den Zutritt des Spermiums zur Oozyte, während der vermutlich kapazitierende Einfluß, auf die ankommenden Spermien, durch die restlichen Kumuluszellen erhalten bleibt (Süss und Stranzinger, 1987b).

Die Zona pellucida ist nicht nur die Hauptbarriere gegen Polyspermie (s. 2.3.2), sondern auch gegen die Penetration von artfremden Spermien. Kapazitierte Spermien einer Tierart sind nicht in der Lage die Zona einer anderen Tierart zu durchdringen. Sie können aber in den artfremden Vitellus eindringen, wenn die Zona entfernt wurde (Kanagawa et al., 1986).

Durch Auflösung der Zona mit Proteasen, vor der IVF, konnten hohe Penetrationsraten erzielt werden; gleichzeitig waren ca.

50% der Oozyten polysperm befruchtet (Fulka et al., 1982). Normal fertilisierte Oozyten besitzen keine kortikalen Granula mehr. Eine unvollständige Exozytose dieser wird als weitere Ursache der Polyspermie angesehen (Brackett, 1983). Der Zonablock wird, zumindest beim Schwein, durch kortikale Granula vermittelt (Cran und Cheng, 1985), wobei die Spermienbindung durch Veränderung der Zonarezeptoren drastisch reduziert wird, und gleichzeitig die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Zona, im Sinne einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen Auflösung (zona hardening), geändert werden (Wolf, 1981).

Neben Polyspermie, die wie schon erwähnt, eine der Hauptursachen für schlechte IVF-Ergebnisse ist, gibt es noch weitere Anomalien von Zygoten, die zu früher embryonaler Mortalität führen können. Ursächlich sind sie meist auf eine fehlerhafte Reifung oder auf Parthenogenese zurückzuführen (Xu und Greve, 1988; Xu et al., 1986). Laut Xu und Greve (1988) sind dies: Polygynie, starke Asynchronität in der Entwicklung von weiblichem und männlichem Vorkern und Aktivierung der Zytokinese vor der Karyokinese (preactivation of cytokinesis).

Verbesserte Methoden für Spermienkapazitation und Oozytenreifung könnten das Auftreten abnormaler Befruchtung verhindern und zur Produktion von normalen Zygoten führen, die sich zu Feten weiterentwickeln können (Xu et al., 1987a).

Schließlich haben auch parthenogenetisch aktivierte Oozyten einen negativen Einfluß auf das IVF-Ergebnis.

In früheren Studien wurde angenommen, daß Parthenogenese bei bovinen IVF-Systemen selten vorkommt (Trousens et al., 1977; Leibfried-Rutledge et al., 1985).

Inzwischen konnte gezeigt werden, daß die parthenogenetische Aktivierung von Oozyten ein größeres Problem bei IVF-Programmen ist, als bisher angenommen.

Rinderoozyten, die in vitro gereift, fertilisiert und 24 h in ligierten Kanincheneileitern inkubiert worden waren, erwiesen sich zu etwa 60% (!) als parthenogenetisch aktiviert (Xu et al., 1986).

Auch in vivo gereifte, tubare Oozyten werden zu einem hohen Prozentsatz parthenogenetisch aktiviert, wenn sie nur kurze Zeit (30 Minuten bis 2 Stunden) im, für die Spulung, exziierten Eileiter belassen bleiben (Leibfried, unveröffentlicht, in First und Parrish, 1987).

Die 24-48 stündige Inkubation von in vitro gereiften, nicht inseminierten Rinderoozyten in Kaninchen-, Schaf- und Schweineeileitern führte ebenfalls zu einer hohen Parthenogeneserate (60%). Das höchste Entwicklungsstadium war ein Achtzeller. Eine zytogenetische Studie zeigte, daß die parthenogenetische Aktivierung der bovinen Oozyten nach Inkubation in den Eileitern stattfand (Xu, 1987).

Eine Vielzahl von Substanzen und Stimuli ist in der Lage ein nichtfertilisiertes Ei zu aktivieren, jedoch der genaue Mechanismus, durch den Parthenogenese entsteht, ist unbekannt (Whittingham, 1980).

Parthenoten entwickeln sich bei den meisten Säugetieren, aus unbekannten Gründen, nur bis zu frühen Teilungsstadien (Graham, 1974).

Eine Überprüfung der Fertilisationskriterien, und eine strenge Kontrolle der Oozyten für die IVF erscheint dringend erforderlich, da eine offensichtlich normale, morphologische Erscheinung nicht genügend verlässlich ist (Xu et al., 1986).

2.5 Die Kultur von Rinderembryonen in vitro

Seit 1946 werden Rinderembryonen in einer Vielzahl von Medien und Kultursystemen in vitro kultiviert (zur Übersicht s. Wright und Bondioli, 1981).

Es stellte sich heraus, daß frühe Teilungsstadien (weniger als 8 Zellen) schwieriger zu kultivieren sind, als ältere Embryonen. Keines der verwendeten Medien, Zusätze, Kultursysteme und Gasatmosphären erwies sich als deutlich überlegen, jedoch erschien Ham's F10, als das Medium der Wahl für Rinderembryonen, was in späteren Untersuchungen bestätigt wurde

(Wright und Bondioli, 1981; Plante et al., 1986; Smith et al., 1986).

In den letzten Jahren werden im Rahmen von ET (Embryotransfer) -Programmen beim Rind praktisch ausschließlich uterine Embryonen verwendet. Dadurch wurde die in vitro Kultur von Embryonen, v.a. als Möglichkeit zur kurzzeitigen Lagerung von Morulae und Blastozysten vor dem Transfer untersucht (Betttridge, 1988; Heyman et al., 1987).

Das Hauptinteresse aus der Sicht des kommerziellen ET besteht gegenwärtig in der Verfügbarkeit von verlässlichen, stabilen Kulturmedienzubereitungen, die die Lebensfähigkeit der Embryonen für relativ kurze Zeit gewährleisten (Bavister, 1988). Rinderembryonen können in vitro erfolgreich vom frühen Morulastadium bis zur Blastozyste bzw. geschlüpften Blastozyste kultiviert werden (Wright et al., 1976a,b).

Durch den Fortschritt auf dem Gebiet der IVF und neuer Biotechnologien, wie Gentransfer und Kerntransfer, ist es notwendig geworden, sehr frühe Teilungsstadien (Zygoten), ohne allzu großen Qualitätsverlust, bis zu unblutig transferierbaren Stadien in vitro zu kultivieren (Heyman et al., 1987). Die Produktion von lebenden Nachkommen aus IVF, die Anwendung der verschiedenen Embryomanipulationstechniken, sowie die Untersuchung der frühen embryonalen Entwicklung wird aber durch das Fehlen eines geeigneten Kulturmediums erheblich eingeschränkt (First und Parrish, 1987; Eyestone et al., 1987b).

Rinderembryonen, die in vitro vom Ein-, Zwei- oder Vierzellstadium an kultiviert werden, entwickeln sich selten über das 8- bis 16-Zellstadium hinaus (Thibault, 1966; Newcomb, 1982; Wright und Bondioli, 1981; Camous et al., 1984; Eyestone und First, 1986).

Diese Untersuchungen führten zu der Vermutung, daß ein Block in der Entwicklung von bovinen 8- bis 16-Zellembryonen existiert (Thibault, 1966; Camous, 1984).

Ähnliche Entwicklungshemmungen werden auch bei anderen Säugetieren beschrieben (s. Bavister, 1988).

Sie sind bei in vitro kultivierten Rinderembryonen eine spezifische Funktion des 8-Zellstadiums und irreversibel (Eyestone und First, 1986).

Die Blocks sind natürlich Artefakte der Kulturbedingungen und liefern wichtige Informationen über die Sensibilität bestimmter Embryonalstadien und deren Wachstumsbedürfnisse (Bavister, 1988).

Durch Studien an den "nucleolus organizer regions" auf den Chromosomen des Rindes (King et al., 1988), konnte gezeigt werden, daß die Blocks in den Entwicklungsstadien auftreten, in denen die Kontrolle der embryonalen Funktionen vom maternalen zum embryonalen Genom übergehen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Zellzyklus verlängert, und RNA-Synthese findet statt. Außerdem wandert im 8-Zellstadium der Rinderembryo vom Eileiter in den Uterus (Betteridge, 1988; Bavister, 1988).

Die Transkription von embryonalen Produkten, die für ein bestimmtes Ereignis der embryonalen Entwicklung, wie Kompaktierung oder Blastulation benötigt werden, wird oft schon vor dem Ereignis abgeschlossen. Das heißt, daß die Unfähigkeit eines Embryos ein bestimmtes kritisches Stadium zu vollziehen, auf ungünstige Bedingungen zurückgeführt werden kann, die schon früher eingewirkt haben.

Die Phase der Aktivierung des embryonalen Genoms, wie auch die Kompaktierung und Blastulation, scheinen besonders empfindlich gegen widrige Umstände zu sein, was sich in der Entwicklung von Blocks in vitro und sogar einer Verzögerung des Teilungsrhythmus in vivo widerspiegelt (Betteridge, 1988).

Es zeigte sich, daß der 8-Zell-Block durch in vivo Zwischenkultur der bovinen Zygoten und frühen Embryonen in ligierten Eileitern von Kaninchen (Boland, 1984; Sirard et al., 1985), Schafen (Eyestone et al., 1985, 1987a; Critser et al., 1986; Lu et al., 1987a) und Färsen (Brackett et al., 1982, 1984; Xu et al., 1987a) erfolgreich umgangen werden kann, unabhängig vom hormonellen Status des Zwischenempfängers (Eyestone et al., 1987a).

Bemerkenswerterweise können die Zygoten bis zum Blastozystenstadium im homologen oder heterologen Eileiter kultiviert werden, was völlig unphysiologisch ist (Bavister, 1988) und auf eine beachtliche Autonomie der frühen Entwicklung hindeutet (Betteridge, 1988).

Diese Experimente zeigten, daß das Ovidukt eine sehr wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der embryonalen Entwicklung spielt, und daß die Ergebnisse der in vivo Kultur im Eileiter in Kulturmedien nicht erreicht werden (Bavister, 1988; Betteridge, 1988).

Dies führte zu der Annahme, daß die Anwesenheit von Eileiterflüssigkeit oder Eileiterepithelzellen in einem Kultursystem eine angemessene Umgebung für eine reguläre Entwicklung von fertilisierten Oozyten bieten würde (Gandolfi und Moor, 1987).

Auch verschiedene andere Zellkulturen sind in der Lage die Entwicklung von Embryonen zu verbessern.

Kuzan und Wright (1981, 1982a,b) zeigten, daß Monolayer von bovinen Fibroblasten, als Nährboden (feeder layer), die Entwicklung von Morulae und Blastozysten in vitro fördern.

Wiemer et al. (1987) fanden, daß fetale, uterine Fibroblasten in Kokultur mit bovinen Embryonen ein exzellentes System für die in vitro Entwicklung von bovinen Morulae sind.

Durch die Zugabe von bovinen Trophoblastvesikeln (TBV, "Embryos" ohne Embryonalscheibe) zum Kulturmedium, erzielten Camous et al. (1984) die Entwicklung von frühen Rinderembryonen über den 8-Zell-Block hinaus. Hierbei war der direkte Kontakt zwischen Embryo und Zellen (TBV) nicht nötig, denn auch konditionierte Medien verbesserten die Entwicklung von Ein- und Zweizellern. Daraus wurde geschlossen, daß von den TBV vermutlich embryotrophe Substanzen ins Medium sezerniert werden (Heyman et al., 1987).

Gandolfi und Moor (1987) konnten in vergleichenden Versuchen zeigen, daß die Effektivität der Unterstützung, der embryonalen Entwicklung, durch somatische Zellen, von der Art der Nährzellen, und vom Entwicklungsstadium des Embryos abhängt.

Obwohl Fibroblasten und TBV die Teilung von fertilisierten Oozyten unterstützen können, sind nur Eileiterzellen in der Lage einen starken Abfall der Lebensfähigkeit *in vitro* zu verhindern (Gandolfi und Moor, 1987).

In ähnlichen Versuchen mit Rinderembryonen (5- bis 8-Zeller), konnte gezeigt werden, daß bovine Eileiterzellen die Entwicklung zu späten Morulae und Blastozysten, über das 8-Zell-Block-Stadium hinaus, unterstützen (Eyestone et al., 1987b; Lu et al., 1987b).

Es ist allerdings nicht klar, ob Oviduktzellen fördernde Faktoren ins Medium sezernieren, oder ob der Eileiter schädliche Substanzen aus dem Medium entfernt, eventuell in Kombination mit der Sezernierung fördernder Substanzen.

In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, daß sich Embryonen bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck besser entwickeln (Quinn und Harlow, 1978).

Möglicherweise reduzieren Eileiterzellen die Sauerstoffspannung in der unmittelbaren Nähe des Embryos und sezernieren embryotrophe Faktoren. Dies würde auch den Unterschied zwischen Fibroblasten und Eileiterzellen erklären, da jene zwar auch die Sauerstoffspannung erniedrigen, aber keine embryotrophen Substanzen produzieren (Bavister, 1988).

Obwohl die Versuche mit Zellkokulturen, und im Besonderen mit Eileiterzellkulturen, die *in vitro* Kultur von frühen Embryonen erheblich vorangebracht haben, sind die Ergebnisse noch immer der *in vivo* Kultur unterlegen (Betteridge, 1988).

Es besteht der dringende Bedarf nach mehr, sorgfältigen und kontrollierten Untersuchungen der aktuellen, metabolischen Bedürfnisse des Embryos, sowie der Faktoren, die seine Lebensfähigkeit beeinflussen (Bavister, 1988).

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Medien

Als Transportmedien für die Ovarien dienten physiologische Kochsalzlösung (NaCl, Oozytengewinnung) und Balanced Salt Solution (BSS, Follikelgewinnung).

Die Aufarbeitung der Oozyten und Spermien, sowie die IVF erfolgten in Modifikationen von TALP (Bavister und Yanagimachi, 1977).

Für die Handhabung der Oozyten außerhalb des CO₂-Brutschanks wurde TALP-Hepes (Critser und Leibfried, 1984, persönliche Mitteilung) verwendet, die Spermaaufbereitung erfolgte mit Sperm-TALP (Parrish et al., 1986) und die Kokultur der Gameten in IVF-TALP (Ball et al., 1983).

(Zusammensetzung der verschiedenen TALP-Medien s. Tabelle 1)

Tabelle 1: Zusammensetzung der TALP-Modifikationen

	TALP-Hepes	Sperm-TALP	IVF-TALP
NaCl (mM)	114,0	99,0	114,0
KCl (mM)	3,16	3,1	3,16
NaHCO ₃ (mM)	2,0	25,0	25,0
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (mM)	0,35	0,35	0,35
Glukose (mM)	5,0	5,0	5,0
Na-Laktat (mM)	10,0	21,6	10,0
Na-Pyruvat (mM)	0,1	1,0	0,1
CaCl ₂ (mM)	2,0	2,0	2,0
MgCl ₂ x 6H ₂ O (mM)	0,5	1,1	0,5
Hepes (mM)	10,0	10,0	-
BSA (mg/ml)	-	6,0	-
FKS (%)	5,0	-	10,0
Penicillin (IU/ml)	100,0	-	100,0
Gentamycin (µg/ml)	50,0	50,0	-
Phenolrot (mg/ml)	0,1	0,1	0,1

Um eine höhere Genauigkeit zu erreichen, wurden die TALP-Medien aus Stammlösungen gemischt.

Zur Induktion der Spermienkapazitation wurde eine, PHE genannte, Losung hergestellt (Ball et al., 1983). Sie besteht aus 0,25 ml Penicillamin (2,0 mM), 0,25 ml Hypotaurin (1,0 mM), 0,1 ml Epinephrin (0,25 mM mit 0,5 mM Natriummetabisulfit) und 0,4 ml physiologische NaCl.

Als Reifungsmedium in Kokultur mit Granulosazellen diente Tissue Culture Medium 199, abgekürzt TCM 199 (Flow Lab.: mit Earle's Salzen, Glutamin und 20 mM Hepes, ohne Natriumbikarbonat), dem routinemäßig 10% FKS (Flow Lab.), 10,0 µg/ml FSH (Burns Biotech.), 0,1 mM Pyruvat (Serva) und 0,1 mg/ml Penicillin-G Natrium Salz (Seromed) zugesetzt wurden.

Je nach Versuchsansatz, wurden zusätzlich 1 µg/ml 17-β-Ostradiol (Sigma) oder 0,3 µg/ml Retinol (Vitamin A) zugegeben.

Die Retinollosung wurde dankenswerterweise vom Institut für Physiologie der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München zur Verfügung gestellt.

Da Ostradiol und Retinol in Athanol gelöst waren, wurde dem Reifungsmedium in Kontrollansätzen eine entsprechende Menge Athanol (1 µl/10 ml Medium) zugesetzt.

Für die Vorbereitung der Oozyten zur IVF und als Transfermedium wurde PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) unter Zusatz von 20% FKS (PBS/FKS) verwendet, dem für die Spulung in vivo kultivierter Embryonen noch 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Seromed) zugegeben wurde (Sirard et al., 1985).

Der pH aller Medien wurde vor Gebrauch auf 7,4 eingestellt, die Osmolarität überprüft (ca. 290 mosm), und alle Medien mit 0,22 µm Milliporefiltern (Minisart) sterilfiltriert.

3.2 Gewinnung der Oozyten und Granulosazellen

Im Zeitraum von Juli 1986 bis November 1987 wurden mehr als 5000 Oozyten in verschiedenen Experimenten verwendet.

Die Rinderovarien für die Gewinnung der Oozyten und Follikel bzw. Granulosazellen wurden vom städtischen Schlachthof München geholt.

Für die Gewinnung der Eizellen wurden Eierstöcke von Kühen und Färsen mit augenscheinlich intaktem ovariellen Zyklus verwendet. Pathologisch veränderte Ovarien und solche von trächtigen Tieren wurden verworfen.

Zur Gewinnung der Granulosazellen wurden Ovarien mit präovulatorischen Follikeln, von Tieren im Proöstrus und Östrus verwendet. Die Bestimmung des Zyklusstandes erfolgte anhand der Morphologie des Corpus luteum (Ireland et al., 1980).

Die Eierstöcke für die Gewinnung der Oozyten wurden in Thermosgefäßen mit ca. 30°C warmer, physiologischer NaCl ins Labor gebracht, während die Ovarien für die Granulosazellgewinnung in eisgekühlter BSS in Isolierbehältern transportiert wurden.

Im Labor wurden zunächst die Oozyten gewonnen.

Mit einem Punktionsgerät (mikro-makro Sauger, Labotect) wurden alle an der Ovaroberfläche sichtbaren Follikel mit einem Durchmesser zwischen 2 und 5 mm punktiert (Kanülenstärke: 0,9 mm), und der Follikelinhalt bei ca. 250 mmHg Punktionsunterdruck in ein konisches Plastikzentrifugenröhrchen (50 ml) abgesaugt.

Aus dem Sediment der gesammelten Follikelflüssigkeit wurden nach 15 Minuten unter dem Stereomikroskop, bei geringer Vergrößerung (12-fach), die Kumulusoozytenkomplexe herausgesucht. Nur Oozyten mit einem unversehrten, kompakten Kumulus und einem gleichmäßig granuliertem Zytoplasma wurden hierbei ausgewählt (Leibfried und First, 1979a). Diese wurden in TALP-Hepes dreimal gewaschen und zusätzlich einer Lebend-Tot-Färbung mit 0,2 %igem Trypanblau unterzogen, so daß nur Oozyten mit ungefärbten, d.h. lebenden Kumulus für die weitere Kultur verwendet wurden.

Bis zur endgültigen Inkubation in Granulosakokultur wurden die selektierten Oozyten in Reifungsmedium ohne Zellen überführt.

Von der Entnahme der Ovarien auf dem Schlachthof, bis zu diesem Zeitpunkt, vergingen, je nach Anfall von brauchbaren weiblichen Schlachtrindern, ca. 4 Stunden, und für die anschließende Gewinnung der Granulosazellen wurden weitere 2-3 Stunden benötigt.

Mit Hilfe eines Skalpell's wurden große, sprungreife Follikel (Durchmesser: > 10 mm) aus dem Ovar herausgelöst, und die verbliebenen Bindegewebsschichten unter dem Stereomikroskop mit feinen Uhrmacherpinzetten (Frohnhäuser, Inox 4) und Scheren vorsichtig bis zur Theka follikuli abpräpariert. Freipräparierte Follikel, die bei einer Qualitätsbestimmung nach Kruip und Dieleman (1982) den Kategorien "nicht atretisch" und "leicht atretisch" zugeordnet werden konnten, wurden für die Gewinnung der Granulosazellen verwendet (Abbildung 1).

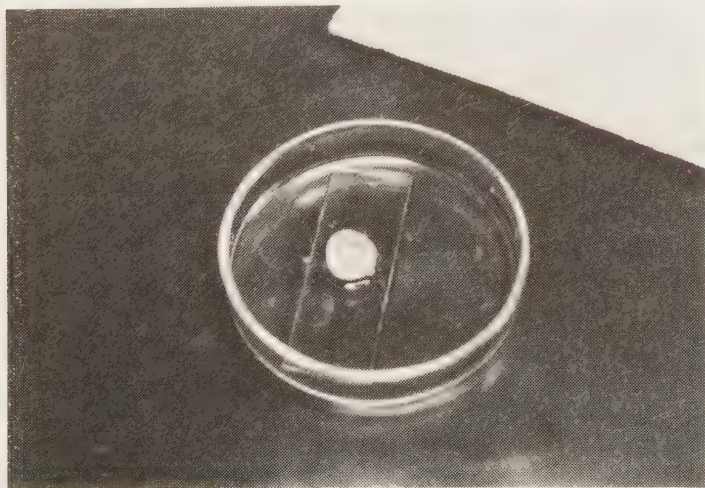


Abbildung 1: Freipräparierter, nicht atretischer Follikel

Dazu wurde die Theka follikuli eröffnet, umgestülpt, und die Granulosazellschicht mit einer Pinzette in einer Petrischale mit BSS abgestreift. Danach wurden die Zellen im Medium suspendiert, und in einem Zentrifugenglas gesammelt. Die Zellsuspensionen von mehreren Follikeln wurden gepoolt, bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Zellsediment in einer definierten Menge Reifungsmedium resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Zählkammer nach Thoma, und gleichzeitig eine Lebend-Tot-Färbung mit einer 0,01 %igen Trypanblaulösung. Nur Zellsuspensionen mit mindestens 50 % lebenden Zellen wurden für die Kokultur mit Oozyten verwendet, bei der die Zellkonzentration 1×10^6 Zellen/ml Reifungsmedium betrug (Critser et al., 1986).

3.3 Oozytenreifung in Kokultur mit Granulosazellen

Die Oozytenreifung in Granulosakokultur wurde in verschiedenen Kultursystemen (statisch und nicht statisch), mit verschiedenen Zusätzen (17- β -Östradiol und Retinol) und bei verschiedenen Reifungstemperaturen (37°C und 39°C) durchgeführt.

Das Reifungs- bzw. Kokulturmedium, einschließlich Standardzusätze, war bei allen Versuchsreihen das gleiche (s. 3.1).

In der ersten Versuchsreihe wurden Oozyten vergleichend in einem statischen und in einem nicht statischen System bei 37°C gereift. 2 Stunden nach Inkubationsbeginn und am Ende der Inkubationszeit wurden Medienproben zur Bestimmung des 17- β -Östradiol- und Progesterongehalts entnommen. Die Proben wurden zunächst eingefroren (-20°C) und nach Ablauf der Versuchsreihe mittels Radioimmunoassay (RIA) analysiert. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan durchgeführt.

Die zweite und dritte Versuchsreihe fanden im nicht statischen

schen Kultursystem bei 37°C statt. Hierbei wurde dem Reifungsmedium jeweils 17- β -Ostradiol bzw. Retinol, im Vergleich zu Kontrollansätzen zugegeben, denen eine entsprechende Menge Äthanol zugesetzt worden war (s. 3.1).

In der vierten Versuchsreihe erfolgte die Reifung vergleichend bei 37°C und 39°C im statischen System.

Eine fünfte Versuchsreihe wurde als Optimierungsansatz abgeschlossen, bei der die Oozyten unter Zusatz von 17- β -Östradiol im nicht statischen System bei 37°C gereift wurden.

Alle statischen Versuchsansätze erfolgten im Brutschrank mit einer Gasatmosphäre von 5 % CO₂ in Luft maximaler Feuchtigkeit in Petrischälchen (Nunc) mit 10 ml Reifungsmedium, ca. 10×10^6 Granulosazellen und 40-60 Oozyten pro Schälchen.

Die nicht statischen Versuchsansätze wurden in einem Wasserbadschüttler (G76, New Brunswick) bei 20-30 Bewegungen/min in gasdicht verschlossenen (5 % CO₂ in Luft) 100 ml Erlenmeyerkolben mit ebenfalls 10 ml Reifungsmedium, ca. 10×10^6 Zellen und 40-60 Oozyten ausgeführt.

Nach 24 Stunden Inkubation wurde an einem repräsentativen Teil der Oozyten die Kernreifung beurteilt. Hierzu wurden von den Eizellen enzymatisch (Hyaluronidase und Trypsin/EDTA) und mechanisch (wiederholtes Aufsaugen in eine feine Glaspipette) die Kumuluszellen entfernt. Anschließend konnten die nackten Oozyten unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein des 1. Polkörperchens untersucht werden (160-fach, Zeiss ICM 405). Als gereift wurden Oozyten beurteilt, bei denen ein oder zwei Polkörperchen im perivitellinen Raum vorhanden waren. Die Meioseerate beschreibt den prozentualen Anteil der gereiften Oozyten, nach Abzug der degenerierten Oozyten.

3.4 Vorbereitung der Oozyten für die IVF

Nach Beendigung der Reifung wurden die Oozyten in drei Gruppen unterteilt.

Die erste Gruppe (I) blieb unbehandelt und wurde mit voll-

ständigem Kumulus in vitro fertilisiert.

Bei der zweiten Gruppe (II) wurde vor der IVF mit Hilfe von Hyaluronidase (1×10^4 U/ml, ovine, Serva) ein Teil des umgebenden Kumulus entfernt.

Die dritte Gruppe (III) wurde durch wiederholtes Pipettieren in Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %, Flow) vor der IVF fast vollständig denudiert.

Danach wurden die Oozyten der Gruppen II und III mehrmals in PBS/FKS gewaschen und bis zur IVF im letzten Waschtropfen im Brutschrank belassen.

3.5 Spermaaufbereitung

Für die in vitro Fertilisationsversuche wurde ausschließlich TG-Sperma verwendet.

In der ersten Versuchsreihe wurde das Sperma der Bullen Balkan (*52260.63), Metan (*52224.8), Alpin (*6829.6), Haza (*52305.55), Harutz (*52301.73), Halpert (*8575.31) und Hetero (*6842.35), das von der Besamungsstation Meggle, Reitmehring zur Verfügung gestellt worden war, alternierend im Vergleich mit dem der Bullen Napoleon (*632-9970.99) und Hassan (*177-700.70) auf seine in vitro Fertilisationsfähigkeit untersucht. Das TG-Sperma von Napoleon und Hassan stammte von der Besamungsstation Mülligen und Bütschwil des Schweizerischen Verbandes für künstliche Besamung.

Ab der zweiten Versuchsreihe wurde nur noch Sperma des Bullen Napoleon verwendet.

Das Sperma wurde nach einer Kombination der von Parrish et al. (1986) und Greve et al. (1986) beschriebenen Methoden aufgearbeitet.

Für jeden Versuchsansatz wurden drei 250 µl Pailletten (straws, cassou fine) eines Bullen eine Minute lang in 35°C warmen Wasser aufgetaut, und ihr Inhalt in einem Plastikreagenzröhrchen gepoolt. Zwei weitere Reagenzröhrchen wurden mit je 1 ml Sperm-TALP befüllt, anschließend mit je 250 µl Sperma

vorsichtig unterschichtet, verschlossen und für 60 min in ein 39°C warmes Wasserbad zum sog. swimup gestellt. Die vorwärtsbeweglichen Spermien schwimmen hierbei aus dem Verdunner in das überschichtete Medium (s. 2.4.3.2), wo sie sich anreichern. Nach 60 min wurden ca. 850 µl Medium je Röhrchen vorsichtig abgezogen und in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Diese swimup-separierte Spermienfraktion wurde bei 200 g 10 min zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen, das Spermapellet in der gleichen Menge Sperm-TALP resuspendiert und noch einmal bei 200 g 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf 200 µl entfernt, zu dem resuspendierten Spermienkonzentrat 1 µl Heparinlösung (Endkonzentration 10 µg/ml, Na-Salz, Sigma) gegeben und 15 min in 39°C warmen Wasserbad präinkubiert.

Stichprobenartig wurde eine Dichtebestimmung durchgeführt (Zählkammer nach Thoma), wobei das 200 µl Spermienkonzentrat stets eine Dichte von ca. 50×10^6 Spermien/ml aufwies, was eine Endkonzentration von ca. 2×10^6 Spermien pro ml Fertilisationsmedium ergab.

3.6 In vitro Fertilisation

Die IVF erfolgte in Mikrotropfenkultur unter Paraffinüberschichtung, bei 39°C, 5 % CO₂ in Luft maximaler Feuchtigkeit. Den 45 µl Tropfen von IVF-TALP wurde, nach 1-2 stündiger Äquilibration des pHs im Brutschrank, je 2 µl PHE und 1 µl Heparin zugegeben, wodurch eine Endkonzentration von 20 µM Penicillamin, 10 µM Hypotaurin, 1 µM Epinephrin und 10 µg/ml Heparin erreicht wurde. Diesen Fertilisationstropfen wurden je 5 Oozyten und 2 µl Spermienkonzentrat zugesetzt, so daß die Tropfen schließlich ein Volumen von ca. 50 µl hatten.

Um die Konzentration der Medientropfen möglichst konstant zu halten, wurde das verwendete Paraffin (dickflüssig) mit PBS äquilibriert. Äquilibriertes Paraffin ist mit Feuchtigkeit

gesättigt und entzieht Mikrotropfen keine Flüssigkeit. Nicht inseminierte Fertilisationstropfen mit Oozyten dienten als Parthenogenesekontrolle.

Nach 24 stündiger Koinkubation der Gameten, wurde ein Teil der Oozyten einer Fertilisationsbeurteilung unterzogen.

Hierzu wurden die Oozyten wiederum enzymatisch (Trypsin/EDTA) und mechanisch denudiert, die einzelnen Gruppen mit Deckgläschen auf Objektträgern festgehalten und in einer Äthanolessiglösung (3 : 1) für 24 h fixiert. Danach erfolgte die mikroskopische Beurteilung im Normallicht oder Interferenzkontrast und nach Färbung mit 1 %igem Aceto-Orcein mittels Phasenkontrast (160- bis 400-fache Vergrößerung).

Als aktiviert wurden Oozyten bezeichnet die, nach 24 stündiger Koinkubation mit Spermien, ein-, zwei- oder mehrere Vorkerne aufwiesen, oder sich bereits zu Zweizellern entwickelt hatten.

3.7 In vivo Kultur

Die für die in vivo Kultur bestimmten Oozyten wurden unmittelbar vor dem "ET" von den Fertilisationstropfen in große Tropfen von Transfermedium (PBS/FKS) umgesetzt und dort bis zum Transfer belassen.

Als Empfänger dienten Kaninchen (v.a. Albino-Hybriden, mit ca. 4 kg KGW), denen ca. 24 h vor dem Transfer 120 IU HCG (Ekluton, Vemie) zur Ovulationsauslösung appliziert wurde, so daß sie sich beim Operationstermin im pseudograviden Zustand befanden.

Die Übertragung der Oozyten wurde in Vollnarkose ausgeführt. 10 min nach der Prämedikation mit Atropin (0,15 mg/kg), wurde eine Neuroleptanalgesie mit Ketamin (50 mg/kg, Ketanest, Parke-Davis) und Xylacin (4 mg/kg, Rompun, Bayer) angewendet. Nach der üblichen Vorbereitung des Operationsfeldes erfolgte ein medianer Zugang in der Linea alba, um die Ovarien und Ovidukte darzustellen. An den Ovarien wurde der Erfolg der

Ovulationsauslösung überprüft (Corpora hämorrhagica), und danach die Eileiter ungefähr 1 cm cranial des Uterushorns ligiert (catgut plain). Mit Hilfe von gebogenen, abgeschmolzenen Glaskapillaren wurden die Oozyten, mit möglichst wenig Transfermedium, über den Fimbrientrichter so tief wie möglich in den Eileiter abgesetzt. Die nicht inseminierte Kontrollgruppe zur Bestimmung der Parthenogeneserate wurde in gleicher Weise in den jeweils kontralateralen Eileiter abgesetzt. Die Bauchdecke wurde in drei Schichten verschlossen (Peritoneum und Unterhaut: catgut, Haut: Synthofil), und die Tiere antibiotisch versorgt.

Nach 96 h wurden die übertragenen Oozyten wiedergewonnen. Dazu wurden die Kaninchen getötet und die Eileiter mit den Eierstocken entnommen. Die Ligaturen wurden gelöst, die Eileiter mit Spülmedium vom Fimbrientrichter aus in Richtung Ligaturstelle gespült, und die Spülflüssigkeit jeweils eines Eileiters in einem Petrischälchen aufgefangen.

Zur Beurteilung wurden die wiedergewonnenen Oozyten bzw. Embryonen in PBS/FKS-Tropfen umgesetzt und zunächst unter dem Mikroskop nativ begutachtet. Ein Teil wurde 24 h in PBS/FKS kultiviert und erneut nativ beurteilt, ein anderer Teil wurde in Äthanolleisessig fixiert, mit Aceto-Orcein gefärbt und bei Phasenkontrast die Zahl der Kerne und die Zahl der Blastomeren bestimmt.

Oozyten wurden als geteilt beurteilt, wenn sie sich in intakte, gleichmäßige Blastomeren geteilt hatten, bzw. wenn die Zahl der Blastomeren der Zahl der Kerne entsprach.

Die Furchung in ungleich große Blastomeren, bzw. ein Mißverhältnis zwischen Blastomeren- und Kernzahl wurde als Fragmentation bewertet.

Als Anzeichen von Degeneration wurden starke Granulierung, Schrumpfung oder Auflösung des Zytoplasmas, sowie teilweise oder völlige Lysis der Zellmembran(en) gewertet.

3.8 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Reifungs-, Fertilisations- und in vivo Kulturergebnisse erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Tests; die Meßdaten von 17- β -Östradiol und Progesteron (RIA) wurden anhand des Student t-Tests verglichen.

4. ERGEBNISSE

4.1 In vitro Reifung (IVM) von Rinderoozyten

Die Ergebnisse der in vitro Reifung von Rinderoozyten in Kokultur mit Granulosazellen dokumentieren den Einfluß von verschiedenen Inkubationssystemen, verschiedenen Medienzusätzen und verschiedenen Reifungstemperaturen auf die Kernreifung.

4.1.1 IVM, gesamt

Von insgesamt 905 beurteilten Oozyten wiesen 24 h nach Inkubationsbeginn 65,9 % ein Polkörperchen und 4,1 % zwei Polkörperchen auf. 6,7 % der Oozyten waren degeneriert.

Daraus ergab sich, nach Abzug der degenerierten Oozyten, eine Meioserate von 75,0 % (Abbildung 2).

Die Meioserate aller Oozyten, die bei 37°C im statischen System (ohne besondere Zusätze zum Reifungsmedium) gereift wurden, betrug 73,6 %. Die Meioserate der bei 39°C im statischen System gereiften Eizellen betrug 68,9 %. Der Unterschied zwischen den beiden Meioseraten ist nicht signifikant. Die bei 37°C im geschüttelten System gereiften Oozyten wiesen, im Vergleich zu den bei 37°C im statischen Inkubationssystem gereiften Oozyten (Meioserate 73,6 %), eine signifikant ($p < 0,01$) höhere Meioserate auf (85,6 %).

Die Zugabe von 17- β -Östradiol, Retinol bzw. Äthanol zum Reifungsmedium (im geschüttelten System) ergab Meioseraten von 78,0 %, 68,3 % bzw. 68,8 %, die sich untereinander nicht signifikant unterschieden. Sie waren im Vergleich zur Meioserate, der ohne Zusätze im geschüttelten System gereiften Oozyten (85,6 %), jedoch niedriger (Östradiol, 78,0 %) bzw. signifikant ($p < 0,01$) niedriger (Retinol, 68,3 %; Äthanol, 68,8 %).

Die Reifungsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: In vitro Reifung von Rinderootzyten

Reifungs- verfahren (Zusätze)	Beur- teilte Oozyten a	1 Polkör- perchen (%) b	2 Polkör- perchen (%) c	Degene- ration (%) d	Meiose- rate (%) (b+c)/(a-d)
37°C statisch (keine)	314 x: 4-36	195 (62,1) x(36,8-100)	25 (8,0) x(2,8-50,0)	15 (4,8)	73,6
39°C statisch (keine)	108 x:23-31	70 (64,8) x(58,1-78,3)	3 (2,8) x(3,2-4,3)	2 (1,9)	68,9
37°C geschüttelt (keine)	163 x: 3-29	134 (82,2) x(66,7-85,0)	3 (1,8) x(3,4-28,6)	3 (1,8)	85,6
37°C geschüttelt (Östradiol)x:	130 4-46	91 (70,0) x(57,1-80,0)	5 (3,8) x(3,7-14,3)	7 (5,4)	78,0
37°C geschüttelt (Retinol) x:	86 4-43	40 (46,5) x(13,6-100)	1 (1,2) x(2,9-2,9)	26 (30,2)	68,3
37°C geschüttelt (Äthanol) x:	104 4-24	66 (63,5) x(25,0-100)	0 (0,0)	8 (7,7)	68,8
Summe	905	596 (65,9)	37 (4,1)	61 (6,7)	75,0

x Variationsbreite der verschiedenen Versuchsansätze (%)

4.1.2 IVM, Versuchsreihen

Bei der Einzelauswertung der verschiedenen Versuchsreihen (s. 3.3) zeigten sich innerhalb und zwischen den Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede der Meioseraten.

Tabelle 3: IVM von Rinderoozyten, Versuchsreihen

Reifungs- verfahren	Beur- teilte Oozyten a	1 Polkör- perchen (%) b	2 Polkör- perchen (%) c	Degene- ration (%) d	Meiose- rate (%) (b+c)/(a-d)
1. Versuchsreihe: geschüttelt - statisch (37°C, ohne Zusätze)					
statisch	198	130 (65,7)	20 (10,1)	13 (6,6)	81,1
geschüttelt	163	134 (82,2)	3 (1,8)	3 (1,8)	85,6
2. Versuchsreihe: Östradiol - Äthanol (37°C, geschüttelt)					
Östradiol	75	54 (72,0)	3 (4,0)	4 (5,3)	80,3
Äthanol	27	17 (63,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	63,0
3. Versuchsreihe: Retinol - Äthanol (37°C, geschüttelt)					
Retinol	86	40 (46,5)	1 (1,2)	26 (30,2)	68,3
Äthanol	77	49 (63,0)	0 (0,0)	8 (10,4)	71,0
4. Versuchsreihe: 39°C - 37°C (ohne Zusätze, statisch)					
39°C	108	70 (64,8)	3 (2,8)	2 (1,9)	68,9
37°C	116	65 (56,0)	5 (4,3)	2 (1,7)	61,4
5. Versuchsreihe: 17-β-Östradiol (37°C, geschüttelt)					
Östradiol	55	37 (67,3)	2 (3,6)	3 (5,5)	75,0
Summe	905	569	37	61	75,0

Nach 24 stündiger Reifung vollendeten in der ersten Versuchsreihe 81,1 % der Oozyten im statischen System die Meiose, und 85,6 % im geschüttelten System.

Die Meioserate bei Zusatz von 17- β -Östradiol zum Reifungsmedium betrug 80,3 %, die der zugehörigen Äthanolkontrollgruppe 63,0 % (zweite Versuchsreihe).

Die Zugabe von Retinol bzw. Äthanol (Kontrolle) zum Reifungsmedium in der dritten Versuchsreihe ergab Meioseraten von 68,3 % bzw. 71,0 %.

In der vierten Versuchsreihe wiesen bei 39°C im statischen System gereifte Oozyten eine Meioserate von 68,9 % auf, und parallel dazu, bei 37°C ebenfalls im statischen System gereifte Oozyten eine Meioserate von 61,4 %.

Durch Zugabe von 17- β -Östradiol zum Reifungsmedium im geschüttelten System wurde in der fünften Versuchsreihe eine Meioserate von 75,0 % erzielt (Tabelle 3).

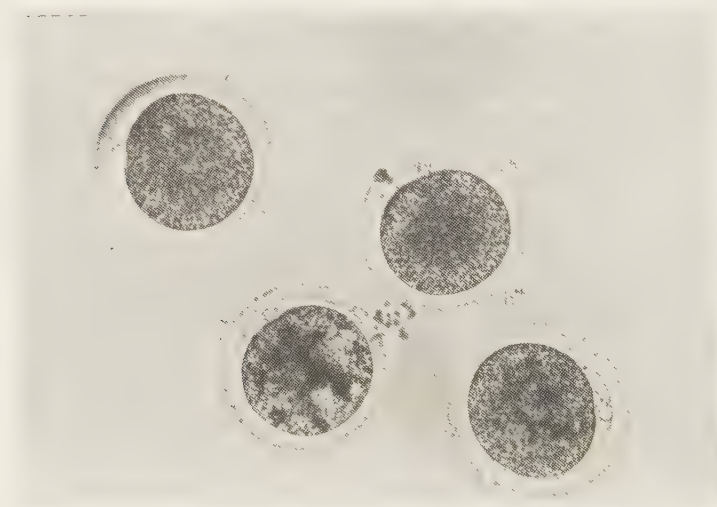


Abbildung 2: Denudierte, in vitro gereifte Rinderoozyten; Polkörperchen im perivitellinen Raum (160fach, Normallicht, nativ)

4.1.3 Hormonanalysen

In der ersten Versuchsreihe wurde von sechs Versuchsansätzen die 17- β -Ostradiol- und Progesteronproduktion der Granulosazellen im Reifungsmedium, vergleichend im statischen und geschüttelten Inkubationssystem, bestimmt.

Der durchschnittliche 17- β -Östradiolwert 2 h nach Inkubationsbeginn lag bei 523 ± 420 pg/ml.

Im statischen System war bei allen Proben 24 h nach Inkubationsbeginn ein Anstieg des 17- β -Östradiolgehaltes im Reifungsmedium zu verzeichnen, wobei sich ein durchschnittlicher Anstieg um 33 % auf 695 ± 436 pg/ml ergab.

Im geschüttelten System wiesen vier Proben einen Anstieg, und zwei einen leichten Abfall des 17- β -Östradiolgehaltes auf, so daß im Durchschnitt ein Anstieg von 30 % auf 679 ± 464 pg/ml resultierte.

Zwischen den ermittelten durchschnittlichen 17- β -Östradiolwerten bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Der Ausgangsprogesteronwert betrug $9,2 \pm 1,4$ ng/ml im Durchschnitt.

Im statischen System fand 24 h nach Inkubationsbeginn ein signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg des Progesteronmittelwertes um 140 % auf $22,0 \pm 7,4$ ng/ml statt, während im geschüttelten System ein signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg von 110 % auf $19,2 \pm 4,9$ ng/ml erfolgte.

Der Unterschied zwischen den durchschnittlichen 24 h Progesteronwerten von statischem und geschüttelten System war nicht signifikant.

4.2 In vitro Fertilisation (IVF)

In den in vitro Fertilisationsversuchen wurden die Einflüsse von Bullenunterschieden, Oozytenvorbereitung und von verschiedenen Reifungsbedingungen in vitro gereifter Oozyten auf die Fertilisationsergebnisse untersucht.

4.2.1 Unterschiede zwischen verschiedenen Bullen

Das Sperma von neun Bullen wurde in der ersten Versuchsreihe auf seine in vitro Fertilisationsfähigkeit überprüft.

Ohne Berücksichtigung des Inkubationssystems (Tabelle 4a) wurde mit dem Sperma des Bullen Napoleon die höchste Aktivierungsrate von in vitro gereiften Oozyten (37°C, statisch + geschüttelt) erzielt (71,6 %). Sie war signifikant ($p < 0,01$ bzw. 0,001) höher, als die mit dem Bullen Hetero (48,2 %) bzw. die mit den übrigen Bullen erzielten Aktivierungsraten. (Hassan, 52,6 %; Harutz, 25,8 %; Alpin, 23,7 %; Balkan, 19,7 %; Metan, 18,0 %; Haza, 9,1 %; Halpert, 0,0 %).

Tabelle 4a: IVF, Bullenunterschiede
3. gesamt (Reifungsmedium, 37°C, ohne Zusätze)

Bulle	Anzahl	Aktivierung (%)	ZZ	2 Vorkerne (% von b)	1 Vorkern (% von b)	Mehrkernig (% von b)
	a	b	c	d	e	f
Napoleon	208	149 (71,6)	2	85 (57,0)	40 (26,8)	22 (14,8)
Hassan	234	123 (52,6)	2	84 (68,3)	27 (22,0)	10 (8,1)
Hetero	56	27 (48,2)	0	16 (59,3)	5 (18,5)	6 (22,2)
Harutz	31	8 (25,8)	0	6 (75,0)	2 (25,0)	0 (0,0)
Alpin	38	9 (23,7)	0	6 (66,7)	3 (33,3)	0 (0,0)
Balkan	61	12 (19,7)	2	5 (41,7)	3 (25,0)	2 (16,7)
Metan	89	16 (18,0)	0	4 (25,0)	12 (75,0)	0 (0,0)
Haza	33	3 (9,1)	0	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)
Halpert	30	0 (0,0)	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

ZZ: Zweizeller

Im statischen Inkubationssystem gereifte Oozyten wurden mit dem Sperma vom Bullen Napoleon zu 72,3 %, mit dem von Hetero zu 51,3 %, von Hassan zu 47,4 %, von Alpin zu 31,6 %, von Balkan zu 18,9 %, von Metan zu 16,7 %, von Harutz zu 13,3 %, von Haza zu 6,3 % und mit dem von Halpert nicht aktiviert.

Tabelle 4b: IVF, Bullenunterschiede
1. statisch (Reifungsmedium, 37°C, ohne Zusätze)

Bulle	Anzahl	Aktivierung (%)	ZZ	2 Vorkerne (% von b)	1 Vorkern (% von b)	Mehrkernig (% von b)
	a	b	c	d	e	f
Napoleon	101	73 (72,3)	1	44 (60,3)	17 (23,3)	11 (15,1)
Hassan	116	55 (47,4)	1	37 (67,3)	13 (23,6)	4 (7,3)
Hetero	29	15 (51,3)	0	9 (60,0)	2 (13,3)	4 (26,7)
Alpin	19	6 (31,6)	0	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0,0)
Balkan	37	7 (18,9)	1	3 (42,9)	2 (28,6)	1 (14,3)
Metan	36	6 (16,7)	0	1 (16,7)	5 (83,3)	0 (0,0)
Harutz	15	2 (13,3)	0	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Haza	16	1 (6,3)	0	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
Halpert	15	0 (0,0)	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

2. geschüttelt (Reifungsmedium, 37°C, ohne Zusätze)

Napoleon	107	76 (71,0)	1	41 (53,9)	23 (30,3)	11 (14,5)
Hassan	118	68 (57,6)	1	47 (69,1)	14 (20,6)	6 (8,8)
Hetero	27	12 (44,4)	0	7 (58,3)	3 (25,0)	2 (16,7)
Harutz	16	6 (37,5)	0	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0,0)
Balkan	24	5 (20,8)	1	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20,0)
Metan	53	10 (18,9)	0	3 (30,0)	7 (70,0)	0 (0,0)
Alpin	19	3 (15,8)	0	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)
Haza	17	2 (11,8)	0	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)
Halpert	15	0 (0,0)	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

ZZ: Zweizeller

Hierbei unterschieden sich die Aktivierungsraten von Napoleon und Hetero statistisch gesehen nicht, und die von Napoleon und Alpin signifikant ($p < 0,05$). Die Aktivierungsraten aller übrigen Bullen waren signifikant ($p < 0,001$) niedriger als die von Napoleon.

Auch im geschüttelten System gereifte Oozyten wiesen bei Inkubation mit Spermien des Bullen Napoleon die höchste Aktivierungsrate (71,0 %) auf. Es folgten Hassan mit 57,6 %, Hetero mit 44,4 %, Harutz mit 37,5 %, Balkan mit 20,8 %, Metan mit 19,8 %, Alpin mit 15,8 %, Haza mit 11,8 % und Halpert mit 0,0 % aktivierten Oozyten.

Mit Ausnahme des Bullen Hassan, waren die mit allen anderen getesteten Bullen erzielten Aktivierungsraten signifikant niedriger, als die mit dem Bullen Napoleon erzielte Aktivierungsrate (Hetero und Harutz, $p < 0,05$; Hassan, Balkan, Metan, Alpin, Haza und Halpert, $p < 0,001$).

Der Anteil der aktivierten Oozyten, die beide, einen oder mehrere Vorkerne aufwiesen war bei allen untersuchten Bullen, in beiden Inkubationssystemen, statistisch nicht unterschiedlich, bzw. nicht auswertbar (s. Tabelle 4b).

Zum Vergleich von in vitro Fertilisationsergebnissen und in vivo Fertilitätsparametern sind in Tabelle 5 die Aktivierungsraten der Bullen von der Besamungsstation Meggle, Reitmehring den im Prüfeinsatz erzielten Non-return Raten gegenübergestellt.

Tabelle 5: Aktivierungsraten und Fertilitätsparameter (Non-return Rate) von 7 Bullen

Name des Bullen	Aktivierungsrate (%)	Non-return Rate (%)
Hetero	27/56 (48,2)	66,7
Harutz	8/31 (25,8)	61,1
Alpin	9/38 (23,7)	55,0
Balkan	12/61 (19,7)	61,2
Metan	16/89 (18,0)	62,5
Haza	3/33 (9,1)	71,0
Halpert	0/30 (0,0)	63,3

4.2.2 Oozytenvorbereitung

Vor der IVF wurden die gereiften Oozyten, zur Untersuchung des Einflusses der Kumuluszellen auf die Fertilisationsergebnisse, in drei Gruppen (I-III) unterteilt (3.4; Tabelle 6). Von insgesamt 414, bei den verschiedenen Reifungsbedingungen gereiften Oozyten der Gruppe I, die mit vollständigem Kumulus fertilisiert wurden, waren 239 (57,7 %) aktiviert. Davon bildeten 203 (84,9 %) männlichen und weiblichen Vorkern, 25 (10,5 %) einen Vorkern und 8 (3,3 %) mehrere Vorkerne aus. 252 (53,3 %) von 473 Oozyten der Gruppe II (Kumulus vor IVF mit Hyaluronidase teilweise entfernt) waren aktiviert. Hier-von bildeten 178 (70,6 %) beide Vorkerne, 49 (19,4 %) einen Vorkern und 24 (9,5 %) mehrere Vorkerne aus. In der Gruppe III (Kumulus vor IVF mit Trypsin/EDTA entfernt) waren 410 (82,5 %) von 479 Oozyten aktiviert, wobei 294 Oozyten (71,7 %) beide Vorkerne, 39 (9,5 %) einen Vorkern und 76 (18,5 %) mehrere Vorkerne ausbildeten (Abbildung 3).

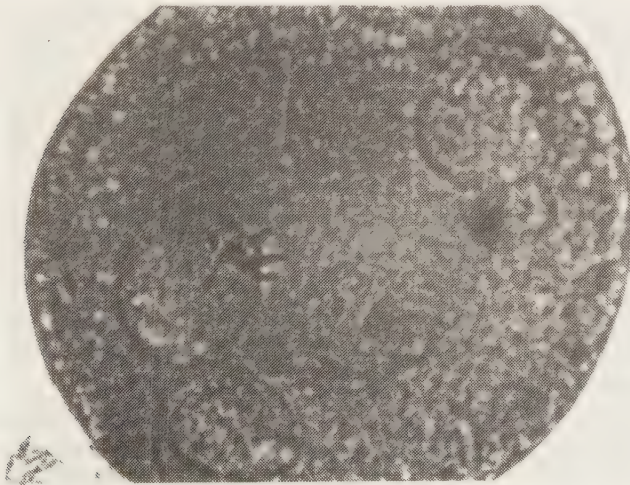


Abbildung 3: Polysperme Rinderoocyte mit vier Vorkernen und drei Spermienschwänzen aus Gruppe III (400fach, Phasenkontrast, fixiert)

Tabelle 6: Einfluß der Oozytenvorbereitung auf die IVF
(Bulle: Napoleon)

Medium	Anzahl	Aktivierung	ZZ	2 Vorkerne	1 Vorkern	Mehrkernig
(Zusätze)		(%)		(% von b)	(% von b)	(% von b)
	a	b	c	d	e	f
stat. I	30	17 (56,7)	0	13 (76,5)	3 (17,6)	1 (5,9)
(-) II	34	24 (70,6)	1	13 (54,2)	9 (37,5)	1 (4,2)
37°C III	37	32 (86,5)	0	18 (56,3)	5 (15,6)	9 (28,1)
gesch. I	28	14 (50,0)	1	11 (78,6)	2 (14,3)	0 (0,0)
(-) II	39	27 (69,2)	0	15 (55,6)	11 (40,7)	1 (3,7)
37°C III	40	35 (87,5)	0	15 (42,9)	10 (28,6)	10 (28,6)
gesch. I	66	43 (65,2)	1	34 (79,1)	5 (11,6)	3 (7,0)
(+Ö.) II	86	56 (65,1)	0	40 (71,4)	7 (12,5)	9 (16,1)
37°C III	92	81 (88,0)	1	50 (61,7)	7 (8,6)	23 (28,4)
gesch. I	62	28 (45,2)	0	25 (89,3)	2 (7,1)	1 (3,6)
(+R.) II	62	25 (40,3)	0	17 (68,0)	6 (24,0)	2 (8,0)
37°C III	69	59 (85,5)	0	42 (71,2)	7 (11,9)	10 (16,9)
gesch. I	94	48 (51,1)	0	39 (81,3)	8 (16,7)	1 (2,1)
(+Ä.) II	116	51 (44,0)	0	39 (76,5)	9 (17,6)	3 (5,9)
37°C III	121	93 (76,9)	0	66 (71,0)	8 (8,6)	19 (20,4)
stat. I	67	46 (68,7)	1	42 (91,3)	3 (6,5)	0 (0,0)
(-) II	66	31 (47,0)	0	24 (77,4)	1 (3,2)	6 (19,4)
39°C III	70	55 (78,6)	0	52 (94,5)	1 (1,8)	2 (3,6)
stat. I	67	43 (64,2)	0	39 (90,7)	2 (4,7)	2 (4,7)
(-) II	70	38 (54,3)	0	30 (78,9)	6 (15,8)	2 (5,3)
37°C III	68	55 (80,9)	0	51 (92,7)	1 (1,8)	3 (5,5)
Summe I	414	239 (57,7)	3	203 (84,9)	25 (10,5)	8 (3,3)
II	473	252 (53,3)	1	178 (70,6)	49 (19,4)	24 (9,5)
III	479	410 (82,5)	1	294 (71,7)	39 (9,5)	76 (18,5)

5. Versuchsreihe (Optimierungsansatz, gesch., (+Ö.), 37°C)

I	154	93 (60,4)	1	72 (77,4)	9 (9,7)	11 (11,8)
III	161	141 (87,6)	0	78 (55,3)	12 (8,5)	51 (36,2)

Ö.: 17- β -Östradiol

R.: Retinol (Vitamin A)

Ä.: Äthanol

I: IVF mit vollständigem Kumulus

II: Kumulus vor IVF mit Hyaluronidase teilweise entfernt

III: Kumulus vor IVF mit Trypsin/EDTA entfernt

ZZ: Zweizeller

Die Aktivierungsraten von Gruppe I und II unterschieden sich statistisch nicht, während sich die von Gruppe I und III sowie II und III signifikant ($p < 0,001$) unterschieden.

Die Raten von zwei Vorkernen der Gruppen I und II sowie I und III waren signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich, die der Gruppen II und III unterschieden sich nicht.

In der Gruppe II bildeten, sowohl im Vergleich zur Gruppe I ($p < 0,01$), als auch zur Gruppe III ($p < 0,001$) signifikant mehr Oozyten einen Vorkern aus. Zwischen Gruppe I und III bestand in dieser Beziehung kein statistischer Unterschied.

Bei der Rate der mehrkernigen Oozyten bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen I und II, II und III ($p < 0,01$) sowie I und III ($p < 0,001$).

Eine analoge Verteilung der Signifikanzen zwischen den Oozytenvorbereitungsgruppen zeigte sich in der fünften Versuchsreihe, in der vor der IVF nur noch eine Einteilung der Oozyten in die Gruppen I und III stattfand. Bezüglich der Aktivierungsraten (I: 60,4 %; III: 87,6 %), der Raten von zwei (I: 77,4 %; III: 55,3 %) und mehreren Vorkernen (I: 11,8 %; III: 36,2 %) unterschieden sich die Gruppen I und III signifikant ($p < 0,001$), während sie sich bei der Rate der Oozyten, die einen Vorkern ausbildeten (I: 9,7 %; III: 8,5 %), nicht unterschieden.

Innerhalb der ersten bis vierten Versuchsreihe (VR) ergab sich im Allgemeinen das gleiche Verteilungsmuster der Fertilisationsergebnisse zwischen den Gruppen I, II und III, wie bei der Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Versuchsreihen. Bei der Aktivierungsrate bestanden signifikante Unterschiede zwischen Gruppe I und III ($p < 0,05$) der 1. VR (statisch), zwischen Gruppe I und III ($p < 0,01$) der 1. VR (geschütt.), zwischen Gruppe I und III ($p < 0,01$) der 2. VR (Östradiol), zwischen Gruppe II und III ($p < 0,001$) der 2. VR (Östrad.), zwischen Gruppe I und III ($p < 0,001$) der 3. VR (Retinol), zwischen Gruppe II und III ($p < 0,001$) der 3. VR (Retinol), zwischen Gruppe I und III ($p < 0,001$) der Äthanolkontrolle, zwischen Gruppe II und III ($p < 0,001$) der Äthanolkontrolle,

zwischen Gruppe I und II ($p < 0,05$) der 4. VR (39°C),
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,001$) der 4. VR (39°C),
 zwischen Gruppe I und III ($p < 0,05$) der 4. VR (37°C) sowie
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,01$) der 4. VR (37°C).

Bei der Zweivorkernrate bestanden signifikante Unterschiede
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,05$) der 4. VR (39°C).

Bei der Einvorkernrate bestanden signifikante Unterschiede
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,01$) der 4. VR (37°C).

Bei der Mehrkernigenrate bestanden signifikante Unterschiede
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,05$) der 1. VR (statisch),
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,05$) der 1. VR (geschütt.),
 zwischen Gruppe I und III ($p < 0,05$) der 2. VR (Östradiol),
 zwischen Gruppe I und III ($p < 0,01$) der Äthanolkontrolle,
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,05$) der Äthanolkontrolle,
 zwischen Gruppe I und II ($p < 0,01$) der 4. VR (39°C) sowie
 zwischen Gruppe II und III ($p < 0,05$) der 4. VR (39°C).

4.2.3 Reifungsbedingungen

Der Einfluß der verschiedenen getesteten Reifungsbedingungen
 (1.-5. VR) auf die *in vitro* Fertilisierbarkeit von Rinder-
 oozyten ist in Tabelle 7 dargestellt.

Die Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf Versuche, die
 mit dem Sperma des Bullen Napoleon durchgeführt wurden. Als
 Parthenogenesekontrolle wurden gereifte Oozyten ohne Spermien
 in Fertilisationstropfen inkubiert.

Von 306, bei 37°C im statischen System (ohne Zusätze) gereif-
 ten Oozyten wurden , nach 24 stündiger Koinkubation , 209
 (68,3 %) aktiviert, wobei bei 164 (78,5 %) aktivierten Oozy-
 ten beide Vorkerne , bei 26 (12,4 %) ein Vorkern und bei 18
 (8,6 %) mehrere Vorkerne ausgebildet wurden.

Bei 39°C im statischen System, waren von 203 gereiften Oozy-
 ten 132 (65,0 %) aktiviert, wovon 118 (89,4 %) beide Vorker-
 ne, 5 (3,8 %) einen Vorkern und 8 (6,1 %) mehrere Vorkerne
 aufwiesen.

Tabelle 7: Einfluß der Reifungsbedingungen auf die IVF
(Bulle: Napoleon)

Medium (Zusätze)	Anzahl a	Aktivierung (%) b	ZZ c	2 Vorkerne (% von b) d	1 Vorkern (% von b) e	Mehrkernig (% von b) f
37°C stat. (-)	306	209 (68,3)	1	164 (78,5)	26 (12,4)	18 (8,6)
39°C stat. (-)	203	132 (65,0)	1	118 (89,4)	5 (3,8)	8 (6,1)
37°C gesch. (-)	107	76 (71,0)	1	41 (53,9)	23 (30,3)	11 (14,5)
37°C gesch. (+Ö.)	559	414 (74,1)	3	274 (66,2)	40 (9,7)	97 (23,4)
37°C gesch. (+R.)	193	112 (58,0)	0	84 (75,0)	15 (13,4)	13 (11,6)
37°C gesch. (+Ä.)	331	192 (58,0)	0	144 (75,0)	25 (13,0)	23 (12,0)
Summe	1699	1135 (66,8)	6	827 (72,9)	134 (11,8)	170 (15,0)

Parthenogenesekontrolle

37°C stat. (-)	99	2 (2,0)			1	1
39°C stat. (-)	68	0 (0,0)				
37°C gesch. (-)	23	0 (0,0)				
37°C gesch. (+Ö.)	155	3 (1,9)		1	1	1
37°C gesch. (+R.)	45	2 (4,4)			2	
37°C gesch. (+Ä.)	70	1 (1,4)			1	
Summe	460	8 (1,7)		1	5	2

Ö.: 17- β -Östradiol

R.: Retinol (Vitamin A)

Ä.: Äthanol

ZZ: Zweizeller

Die Aktivierungsraten und Anteile der mehrkernigen Oozyten unterschieden sich statistisch nicht; zwischen den jeweiligen Anteilen von zwei- und einkernigen Oozyten der beiden Gruppen bestanden signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede.

Von 107 im geschüttelten Inkubationssystem bei 37°C gereiften Oozyten betrug die Aktivierungsrate 71,0 % (76). Davon besaßen 41 (53,9 %) aktivierte Oozyten zwei Vorkerne, 23 (30,3 %) einen Vorkern und 11 (14,5 %) mehrere Vorkerne.

Ein Vergleich zu im statischen System bei 37°C gereiften Oozyten ergab keinen Unterschied zwischen den jeweiligen Aktivierungs- und Mehrkernigenraten. Die beiden Inkubationssysteme unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) bezüglich der Raten der ein- und zweikernigen Oozyten.

Oozyten, die in Reifungsmedium mit 17- β -Östradiol als Zusatz gereift wurden (geschüttelt), wiesen, nach der Inkubation in Fertilisationstropfen, eine Aktivierungsrate von 74,1 % (414/559) auf. 274 (66,2 %) dieser aktivierten Oozyten bildeten zwei Vorkerne, 40 (9,7 %) einen Vorkern und 97 (23,4 %) mehrere Vorkerne aus.

Bei Zugabe von Retinol zum Reifungsmedium wurde nach anschließender IVF derart gereifter Oozyten eine Aktivierungsrate von 58,0 % (112/193) erzielt. Von diesen Oozyten bildeten 84 (75,0 %) zwei Vorkerne, 15 (13,4 %) einen Vorkern und 13 (11,6 %) mehrere Vorkerne aus.

Die Athanolkontrollgruppe wies nach der IVF eine Aktivierungsrate von 58,0 % (192/331) auf, und 144 (75,0 %) der aktivierten Oozyten hatten zwei Vorkerne, 25 (13,0 %) einen Vorkern und 23 (12,0 %) mehrere Vorkerne ausgebildet.

Mit Östradiolzusatz gereifte Oozyten haben keine signifikant höhere Aktivierungsrate (74,1 %), als ohne Zusätze im geschüttelten System gereifte Oozyten (71,0 %). Diese haben eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Aktivierungsrate als unter Zusatz von Retinol bzw. Athanol gereifte Oozyten (58,0 %).

Auch die Aktivierungsrate von mit Östradiol gereiften Oozyten war im Vergleich zu der von mit Retinol bzw. Äthanol gereiften Oozyten signifikant ($p < 0,001$) höher.

Im Vergleich zu den ohne Zusätzen gereiften Oozyten, bildeten unter Zugabe von Östradiol gereifte Oozyten etwas häufiger (nicht signifikant) zwei Vorkerne aus, unter Zusatz von Retinol bzw. Athanol gereifte Oozyten bildeten signifikant ($p < 0,01$) häufiger beide Vorkerne aus. Ein signifikant geringerer ($p < 0,05$) Anteil, der unter Zugabe von Östradiol gereiften Oozyten bildete, im Vergleich zur Athanolgruppe, beide Vorkerne aus (Abbildung 4).

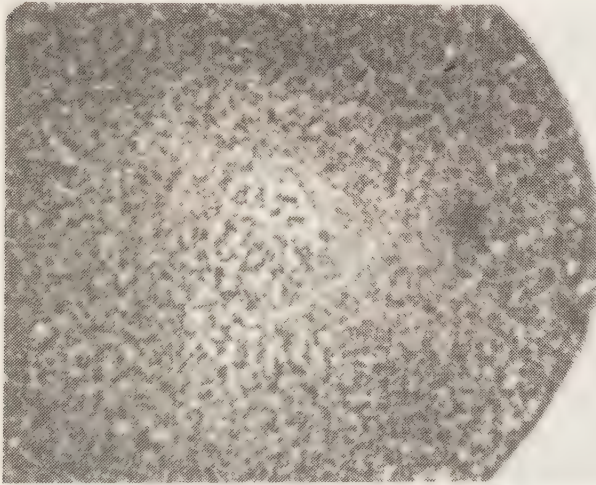


Abbildung 4: Rinderoozyte mit zwei Vorkernen und Spermischwanz
(400fach, Phasenkontrast, fixiert)

Ohne Zusätze gereifte Oozyten hatten, im Vergleich zu mit Östradiolzusatz ($p < 0,001$) und zu mit Retinol- bzw. Äthanolzusatz gereiften Oozyten ($p < 0,01$), einen signifikant höheren Anteil an Oozyten mit einem Vorkern. Zwischen den Zusatzgruppen bestand kein Unterschied.

Mit Östradiolzugabe gereifte Oozyten bildeten signifikant häufiger ($p < 0,01$) mehrkernige Oozyten aus, als unter Zugabe

von Retinol bzw. Äthanol gereifte Oozyten. Ansonsten ergaben sich, bezüglich des Anteils von mehrkernigen Oozyten, keine signifikanten Unterschiede innerhalb der im geschüttelten Inkubationssystem gereiften Oozyten.

Insgesamt wurden von 1699 in vitro gereiften und fertilisierten Oozyten 1135 (66,8 %) aktiviert, wovon 827 (72,9 %) beide Vorkerne, 134 (11,8 %) einen Vorkern und 170 (15,0 %) mehrere Vorkerne ausbildeten.

Parallel dazu wurden von 460 in vitro gereiften, nicht inseminierten Oozyten 8 (1,7 %) aktiviert (1 beide Vorkerne, 5 ein Vorkern, 2 mehrkernig).

Der Unterschied zwischen den Aktivierungsraten beider Gruppen war signifikant ($p < 0,001$).

4.3 In vivo Kultur

Zur Überprüfung der Entwicklungsfähigkeit wurden in vitro gereifte und fertilisierte Rinderoozyten in ligierten Kanincheneileitern in vivo kultiviert.

Die nicht inseminierte Kontrollgruppe zur Überprüfung der Parthenogeneserate wurde in den jeweils kontralateralen Eileiter eines Empfängers übertragen.

Von insgesamt 671 übertragenen Oozyten aller Versuchsreihen konnten, nach 96 stündiger Inkubation im Kanincheneileiter 377 (56,2 %) wiedergewonnen werden. Davon waren 87 (23,1 %) geteilt, 51 (13,5 %) fragmentiert und 75 (19,9 %) degeneriert. Von den geteilten Oozyten hatten sich 29 (33,3 %) zu Zweizellern, 10 (11,5 %) zu Dreizellern, 11 (12,6 %) zu Vierzellern, 21 (24,1 %) zu Achtzellern, 9 (10,3 %) zu Sechszellern und 7 (8,0 %) zu Morulae weiterentwickelt.

In der Parthenogenesekontrollgruppe konnten 59 (64,1 %) von 92 übertragenen Oozyten wiedergewonnen werden. Von den wiedergewonnenen waren 5 (8,5 %) geteilt (4 Zweizeller, 1 Vierzeller), 6 (10,2 %) fragmentiert und 12 (20,3 %) degeneriert (Tabellen 8 und 9; Abbildung 5).

Tabelle 8: In vivo Kultur im Kanincheneileiter

Reifungs- verfahren (Zusätze)	übertragene Oozyten a	wiedergewonnene Oozyten (%) b	Teilungen (%) c	Fragmentation (%) d
37°C, stat. (keine)	106	67 (63,2)	22 (32,8)	8 (11,9)
37°C, gesch. (keine)	111	61 (55,0)	19 (31,1)	6 (9,8)
37°C, gesch. (Östradiol)	182	94 (51,6)	20 (21,3)	8 (8,5)
37°C, gesch. (Äthanol)	174	93 (53,4)	16 (17,2)	18 (19,4)
39°C, stat. (keine)	50	31 (62,0)	4 (12,9)	8 (25,8)
37°C, stat. (keine)	48	31 (64,6)	6 (19,4)	3 (9,7)
Summe	671	377 (56,2)	87 (23,1)	51 (13,5)
Parthenogenesekontrolle (Summe der Versuchsreihen)				
Summe	92	59 (64,1)	5 (8,5)	6 (10,2)

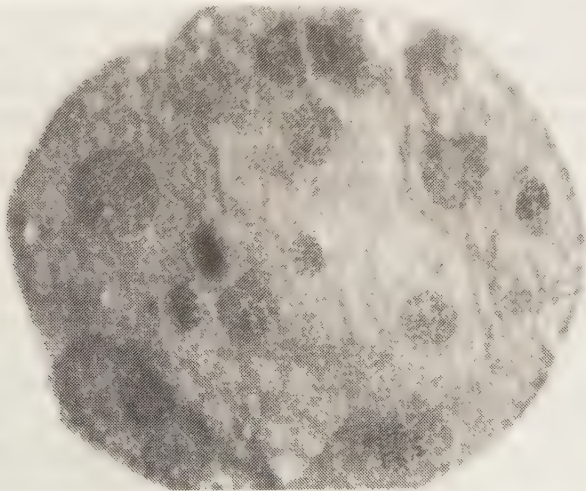


Abbildung 5: Sechzehnzyteller
(400fach, Phasenkontrast, fixiert)

Tabelle 9: In vivo Kultur, Entwicklungsstadien

Reifungs- verfahren (Zusätze)	über- trag. Oozy. a	wieder- gew. O. (%) b	Teilun- gen (%) c	ZZ	DZ	VZ	AZ	SZ	M	Frage- ment. (%) e	Degene- rerat. (%) f
				d (von b)							
37°C, stat. (keine)	106	67 (63,2)	22 (32,8)	8	2	4	6	2	0	8 (11,9)	6 (9,0)
37°C, gesch. (keine)	111	61 (55,0)	19 (31,1)	7	2	3	5	2	0	6 (9,8)	7 (11,5)
37°C, gesch. (Östradiol)	182	94 (51,6)	20 (21,3)	6	2	1	6	3	2	8 (8,5)	32 (34,0)
37°C, gesch. (Äthanol)	174	93 (53,4)	16 (17,2)	3	2	1	3	2	5	18 (19,4)	30 (32,3)
39°C, stat. (keine)	50	31 (62,0)	4 (12,9)	2	1	1	0	0	0	8 (25,8)	0 (0,0)
37°C, stat. (keine)	48	31 (64,6)	6 (19,4)	3	1	1	1	0	0	3 (9,7)	0 (0,0)
Summe	671	377 (56,2)	87 (23,1)	29	10	11	21	9	7	51 (13,5)	75 (19,9)

ZZ: Zweizeller, DZ: Dreizeller, VZ: Vierzeller,
 AZ: Achtzeller, SZ: Sechzehneller, M: Morulae;

Die Teilungsrate der fertilisierten Oozyten war nach in vivo Kultur signifikant ($p < 0,05$) höher als die der Parthenogenesekontrollgruppe. Zwischen den Wiedergewinnungs-, Fragmentations- und Degenerationsraten der beiden Gruppen bestand kein Unterschied.

Ein Vergleich der in vivo Kulturergebnisse der einzelnen Versuchsreihen (s. Tabellen 8 und 9) zeigte, daß sich weder die Wiedergewinnungs-, Teilungs- und Fragmentationsraten, der bei den verschiedenen Reifungsbedingungen gereiften Oozyten, unterschieden, noch die jeweiligen Anteile von Zwei- bis Sechzehnzellern. Morulae konnten nur aus Transfers mit Oozyten, die unter Zusatz von Östradiol bzw. Äthanol zum Reifungsmedium gereift worden waren, gewonnen werden. Die Anteile (2 bzw. 5 Morulae) unterschieden sich nicht.

Da in der ersten bis vierten Versuchsreihe die fertilisierten Oozyten, ohne Rücksicht auf die unterschiedliche Vorbereitung vor der IVF (Gruppen I, II, III), gepoolt übertragen worden waren, wurden in der fünften Versuchsreihe die Gruppen I und III (mit den entsprechenden Parthenogenesekontrollgruppen) jeweils getrennt auf verschiedene Empfänger übertragen.

Die Ergebnisse der fünften Versuchsreihe sind aus Tabelle 10 zu ersehen.

Tabelle 10: Optimierungsansatz (37°C, geschüttelt, Ostradiol)

Oozyten- vorberei- tung	übertragene Oozyten a	wiedergewonnene Oozyten (%) b	Teilungen (%) c	Fragmentation (%) d
I	81	62 (76,5)	9 (14,5)	15 (24,2)
III	87	30 (34,5)	3 (10,0)	8 (26,7)
Parthenogenesekontrolle				
I	20	16 (80,0)	1 (6,3)	0 (0,0)
III	30	8 (26,7)	0 (0,0)	0 (0,0)

Es zeigte sich, daß der Anteil der wiedergewonnenen Oozyten in Gruppe I (76,5 %; 62/81) signifikant ($p < 0,001$) höher war als in Gruppe III (34,5 %; 30/87), und daß in Gruppe III (43,3 %; 13/30) signifikant ($p < 0,001$) mehr Oozyten degeneriert waren, als in Gruppe I (9,7 %; 6/62).

Die Teilungs- und Fragmentationsraten der Gruppen I und III unterschieden sich nicht.

Bei der Parthenogenesekontrolle konnten ebenfalls in der Gruppe I signifikant ($p < 0,001$) mehr Oozyten wiedergewonnen werden (80,0 %; 16/20), als in Gruppe III (26,7 %; 8/30).

Die Teilungsraten der fertilisierten Oozyten von Gruppe I (14,5 %; 9/62) und III (10,0 %; 3/30) unterschieden sich nicht signifikant von der Parthenogeneserate der entsprechenden Kontrollgruppe (I: 6,3 %, 1/16; III: 0,0 %, 0/0).

4.4 Effizienz von IVM und IVF Programmen

Zur Beurteilung der Effizienz der vorliegenden Versuche wurden die Anteile aller gereiften, aktivierten, geteilten und physiologisch weiterentwickelten Oozyten zueinander in Beziehung gesetzt (Tabelle 11).

Von insgesamt 844 vitalen Oozyten (abzüglich 61 degenerierter Oozyten) waren nach 24 stündiger Inkubation bei den verschiedenen Kulturmodifikationen 633 gereift. Dies entspricht einer Effizienz von 75 %.

Nach der 24 stündigen Koinkubation von 1699 gereiften Eizellen mit aufbereiteten Spermien waren 1135 (67 %) aktiviert, was, bezogen auf die gereiften Oozyten, einer Effizienz der Aktivierung von 89 % entspricht.

Die Effizienz der Wiedergewinnung nach 96 stündiger in vivo Kultur im Kanincheneileiter betrug 56 %, wobei von 671 übertragenen Oozyten 377 wiedergefunden wurden.

Von den 377 wiedergewonnenen Oozyten hatten sich 87 (23 %) in Kultur geteilt, und 7 (8 %), entsprechend der Kulturdauer, zu den physiologisch erwarteten Morulastadien weiterentwickelt. Daraus resultiert eine Gesamteffizienz (Morulae/vitale Oozyten) von etwa 0,6 %.

Tabelle 11: Effizienz von IVM und IVF Programmen

Effizienz der einzelnen Stufen (%)			
vitale Oozyten		93	
Oozytenreifung		75	
Oozytenaktivierung		89	
Wiedergewinnung		56	
Teilung (ZZ - M)		23	
Morulae		8	
Beurteilte Oozyten	gereift (%)	aktiviert (%)	geteilt (%)
IVM	844*	633 (75)	
IVF	1699	1135 (67)	
in vivo Kultur	377		87 (23)

*abzüglich 61 degenerierter Oozyten

ZZ: Zweizeller, M: Morulae;

5. DISKUSSION

5.1. Einfluß von Kulturbedingungen auf die vollständige Reifung von Rinderoozyten

Rinderoozyten aus kleinen antralen Follikeln scheinen in der Gegenwart von Granulosazellen oder einer ausreichenden Anzahl von Kumuluszellen im Kulturmedium fähig zu sein, vollständig *in vitro* zu reifen und somit die volle Weiterentwicklungsfähigkeit zu erreichen.

Nach IVF und *in vivo* Kultur derart gereifter Oozyten konnten Morulae und Blastozysten, und nach Transfer dieser Embryonen auf Empfänger konnten Trachtigkeiten und lebende Kalber erzielt werden, womit die genannte Annahme bewiesen war (Critser et al., 1986; Lu et al., 1987a; Xu et al., 1987a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluß von Modifikationen der Kulturbedingungen auf die Kokultur von Rinderoozyten mit Granulosazellen, hinsichtlich einer vollständigen Reifung untersucht (Tabellen 2, 7, 8, 9).

Oozyten, die statisch auf Granulosazellmonolayern kultiviert werden, sind schon in frühen Phasen der Reifung hohen Progesteronspiegeln ausgesetzt. Dies konnte z.T. die Ursache für Abnormalitäten sein, die bei diesem Kultursystem auftreten (Moor et al., 1980b; Staigmler und Moor, 1984).

In einem nichtstatischen Kultursystem ähnelt die Steroidzusammensetzung derjenigen in der Follikelflüssigkeit präovulatorischer Follikel, mit erst in der zweiten Hälfte der Reifung ansteigenden Progesteronspiegeln (Staigmler und Moor, 1984).

Dementsprechend waren in den vorliegenden Versuchen im nichtstatischen Kultursystem (langsames Schütteln der Granulosazellkulturen im Wasserbadschüttler) signifikant ($p < 0,01$) mehr Oozyten gereift als im statischen System bei 37°C. Bei der Analyse des Steroidgehaltes beider Inkubationssysteme mit RIA stellte sich außerdem heraus, daß die Progesteronkon-

rentation im geschüttelten System nach 24 stündiger Kultur geringer war als im statischen System.

Die durchschnittlichen 24 h Progesteronwerte lagen in beiden Systemen geringfügig unter dem Wert, der von Moor et al. (1978) in der Follikelflüssigkeit von großen, nichtatretischen Follikeln gefunden worden war. Dies spricht dafür, daß die verwendeten Granulosazellen tatsächlich von funktionierenden Follikeln stammten.

Die durchschnittlichen 24 h Östradiolwerte waren in beiden Inkubationssystemen annähernd gleich und lagen ca. um den Faktor 100 niedriger, als die von Kruip und Dieleman (1982) in der Follikelflüssigkeit von nichtatretischen Follikeln (Durchmesser > 8 mm) gemessenen Werte.

Durch Zugabe von 17- β -Östradiol zum Reifungsmedium (geschütteltes System) wurde keine Erhöhung der Meiose rate erzielt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Meinung der meisten Autoren überein, die keine Abhängigkeit der Fortsetzung der Meiose von Steroiden sehen (Lindner et al., 1974; Thibault et al., 1975; Thibault, 1977).

Physiologische Steroidmuster und -konzentrationen, insbesondere von 17- β -Östradiol, sind jedoch für die vollständige Reifung und damit für die Erlangung der Fertilisierbarkeit und Weiterentwicklungsfähigkeit von grundlegender Bedeutung (Moor und Trounsen, 1977; Moor und Warnes, 1978; Moor et al., 1980b).

Deshalb setzten u.a. Staigmiller und Moor (1984) oder auch Critser et al. (1986) dem Reifungsmedium 17- β -Östradiol zu und inkubierten außerdem im geschüttelten System, um so bestmögliche Voraussetzungen für die Aufrechterhaltung eines korrekten Steroidgleichgewichts zu erreichen.

Im Einklang damit wurde in den eigenen Versuchen im geschüttelten System (ohne Zusätze) die zweithöchste Aktivierungsrate erreicht und bei Zusatz von 17- β -Östradiol (geschütteltes System) die höchste. Auch konnten von den im geschüttelten System mit Östradiolzusatz gereiften Oozyten, nach 96 stündiger in vivo Kultur im Kanincheneileiter, Morulae wie-

dergewonnen werden.

Allerdings ist der positive Steroideinfluß nicht eindeutig. Einerseits war die Rate der Oozyten, die zwei Vorkerne aufwiesen, d.h. physiologisch fertilisiert waren, bei diesen beiden Gruppen signifikant ($p < 0,01$ und $< 0,05$) niedriger als bei der Athanolkontrollgruppe. Und bei der Gruppe, der im geschüttelten System (ohne Zusätze) gereiften Oozyten, wurden außerdem signifikant ($p < 0,001$) seltener zwei Vorkerne ausgebildet als bei im statischen System gereiften Oozyten. Andererseits hatten sich auch Oozyten der Athanolkontrollgruppe in vivo Kultur im Kanincheneileiter zu Morulae weiterentwickelt (Tabelle 9).

Steroide sind jedoch nur eines der vielen, von den Follikelzellen stammenden Signalen, die von der Oozyte zur Reifung benötigt werden (Staigmiller und Moor, 1984).

Bei den Haussäugetieren wird neusynthetisierte mRNA und damit Proteinneusynthese sowohl für die Kumulusexpansion, als auch für die Regulation der Zytoplasma- und Kernreifung benötigt (Osborn und Moor, 1983; Hunter und Moor, 1987). Dabei ist allerdings nicht klar, ob die Neusynthese von mRNA (Transkription) innerhalb der Oozyte oder in den Kumuluszellen stattfindet (Osborn und Moor, 1983).

Vitamin A (Retinol) beeinflusst vermutlich die Synthese der mRNA (Wolf, 1984), wodurch Vitamin A letztlich einen Einfluß auf die vollständige Reifung haben konnte. Schweigert et al. (1986) konnten erstmals einen Zusammenhang zwischen Follikelqualität und Vitamin A-Gehalt der Follikelflüssigkeit zeigen. In den Versuchen von Lutterbach (1987) erbrachte die Zugabe von Retinol zum Reifungsmedium jedoch keine nennenswerte Verbesserung der Reifungs- und Fertilisationsergebnisse, und in den eigenen Versuchen resultierte die Zugabe von Retinol sogar in einer, im Vergleich zu ohne Zusätze im geschüttelten System gereiften Oozyten, signifikanten ($p < 0,01$) Verminderung der Meiose rate. Das deutet darauf hin, daß Retinol zumindest keinen Einfluß auf die Kernreifung besitzt.

Auch die Aktivierungsrate der unter Retinolzusatz gereiften

Oozyten war signifikant ($p < 0,05$) niedriger als die der ohne Zusatz im geschüttelten System gereiften Oozyten. Allerdings war der Anteil der Eizellen mit zwei Vorkernen signifikant ($p < 0,01$) höher als bei ohne Zusatz gereiften Oozyten, woraus man schließen konnte, daß Retinol die Zytoplasmareifung und damit die Ausbildung des männlichen Vorkerns bzw. des MPOF (Thibault et al., 1975; Thibault, 1977) fördert.

Weil jedoch auch in der Athanolkontrollgruppe ein gleich großer Anteil der Oozyten beide Vorkerne ausbildete, ist diesem Schluß die Grundlage entzogen.

Leider konnte die Weiterentwicklungsfähigkeit der unter Retinolzusatz gereiften Oozyten nicht durch in vivo Kultur im Kaninchenovulator überprüft werden, da zum damaligen Zeitpunkt keine geeigneten Empfängertiere zur Verfügung standen. Lenz et al. (1983a) sowie Katska und Smorag (1985) stellten fest, daß sowohl bei einer Reifungstemperatur von 39°C als auch von 37°C gleich viele Oozyten in herkömmlichen Medien (TALP bzw. TCM 199) die Metaphase II erreichten.

In den eigenen Versuchen bestand ebenfalls kein Unterschied zwischen den Meiosezeiten von bei 39°C und im Vergleich dazu bei 37°C in Kokultur mit Granulosazellen im statischen System gereiften Oozyten. Dies zeigt, daß die Reifungstemperaturen in diesem Temperaturbereich keinen wesentlichen Einfluß auf die Kernreifung haben.

Es scheint allerdings ein Einfluß der Reifungstemperatur auf die vollständige Reifung, zumindest aber auf die Fertilisierbarkeit zu bestehen, da Lenz et al. (1983a) signifikant ($p < 0,01$) höhere Fertilisationsraten erhielten, wenn die Oozyten bei 39°C gereift worden waren, als wenn sie bei 35°C , 37°C oder bei 41°C gereift worden waren.

Ewar unterschieden sich bei den eigenen Ergebnissen die Aktivierungsraten der bei 39°C bzw. bei 37°C im statischen System gereiften Oozyten nicht, doch wiesen bei 39°C gereifte Oozyten signifikant ($p < 0,05$) häufiger zwei Vorkerne auf.

Die in vivo Kulturergebnisse ließen keinen Einfluß der beiden unterschiedlichen Reifungstemperaturen erkennen.

5.2 Einfluß der Oozytenvorbereitung auf Fertilisierbarkeit und Weiterentwicklungsfähigkeit

Durch unterschiedliche Oozytenvorbereitung vor der IVF (Gruppe I-III) wurde, parallel zum Einfluß der Reifungsbedingungen, der Einfluß der Kumuluszellen auf die Fertilisations- und Kulturergebnisse untersucht (Tabelle 6 und 10).

- Fertilisationsergebnisse

Ball et al. (1983) beobachteten, daß in vitro gereifte Oozyten, die mit vollständigem, expandierten Kumulus in vitro fertilisiert worden waren, signifikant ($p < 0,01$), häufiger auch den männlichen Vorkern ausbildeten, als vor der IVF denudierte Oozyten.

Lambert et al. (1986) fanden bei in vivo gereiften Oozyten ähnliche Ergebnisse.

Auch in den eigenen Versuchen wiesen Oozyten, die mit vollständigem, expandierten Kumulus fertilisiert worden waren (Gruppe I), signifikant ($p < 0,001$), häufiger mehrere Vorkerne auf, als Oozyten, die denudiert bzw. teilweise denudiert (Gruppe III bzw. II) fertilisiert worden waren.

Einige Autoren vertreten die Auffassung, daß eine teilweise Entfernung der expandierten Kumulusmassen vor der IVF den Zutritt der Spermien zur Ei erleichtert, und die verbleibenden Kumuluszellen ausreichen, um den positiven Einfluß auf die Fertilisationsergebnisse auszuüben (Gucco und Strenzinger, 1987b; Xu, 1987).

Dies konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden, da Oozyten, deren Kumulus vor der IVF teilweise entfernt worden war (Hyaluronidase), die gleichen Aktivierungsraten hatten wie Oozyten der Gruppe I, aber, ebenso wie Gruppe III, eine signifikant ($p < 0,001$) kleinere Rate an Eizellen mit zwei Vorkernen als Gruppe I.

Oozyten, die vor der IVF völlig denudiert worden waren (Gruppe III), wiesen signifikant ($p < 0,001$) höhere Aktivierungsraten auf als Oozyten der Gruppen I und II, was darauf

hindeutet, daß durch die bei Gruppe III zur Denudierung verwendete Protease (Trypsin/EDTA) nicht nur die Kumuluszellen entfernt wurden, sondern auch ein Teil der Zona und damit der Zonablock beschädigt wurden.

Fulka et al. (1982) erzielten in ihren Versuchen mit zonafreien Rinderoozyten erheblich höhere Penetrationsraten als Brackett et al. (1980), die Oozyten mit intakter Zona pellucida fertilisierten.

Daraus kann geschlossen werden, daß bei den Oozyten der Gruppe II zuviel Kumulus entfernt worden war, und der fertilisationsfördernde Einfluß der restlichen Kumuluszellen somit nicht ausreichte um ähnlich hohe oder sogar höhere Zweivorkernraten wie bei Gruppe I zu erreichen. Da aber die Zona noch intakt war, wurden, wie bei Gruppe I, signifikant ($p < 0,001$) schlechtere Aktivierungsraten erzielt, als in Gruppe III (s.o.).

In den genannten Versuchen von Fulka et al. (1982) waren ca. 50 % der penetrierten Oozyten polysperm befruchtet.

Ball et al. (1983) beobachteten in ihren Versuchen vermehrt polysperme Befruchtung bei denudiert fertilisierten Oozyten, woraus insgesamt eine Polyspermierate von 17 % resultierte.

In der vorliegenden Arbeit waren durchschnittlich 18,5 % der Oozyten der Gruppe III bzw. bei Einbeziehung der Gruppe III der fünften Versuchsreihe 23,0 % polysperm oder mehrkernig. In Anbetracht der genannten Ergebnisse, deutet dies darauf hin, daß die Zonareaktion durch die oberflächliche Proteolyse der Zona mit Trypsin/EDTA nicht völlig außer Kraft gesetzt war.

Die Oozyten der Gruppe I wurden signifikant seltener polysperm befruchtet als Oozyten der Gruppe II ($p < 0,01$) bzw. der Gruppe III ($p < 0,001$).

Der Unterschied zwischen Gruppe I und II läßt sich dadurch erklären, daß die Spermien bei Oozyten der Gruppe I, im Vergleich zu denen der Gruppe II, längere Zeit benötigten, um durch die Kumuluszellen zur Oozyte zu gelangen (Süss und Stranzinger, 1987b; Xu, 1987), und somit die Polyspermie-

blocks genügend Zeit hatten, sich zu etablieren.

Frühe Blocks gegen Polyspermie werden bei Säugetieroozyten nicht so schnell ausgebildet wie bei Invertebraten (Kauf, 1981), und in vitro gereifte Oozyten entwickeln die Zonareaktion vermutlich nicht mit der gleichen Effektivität wie in vivo gereifte Oozyten (Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Trotz des z.T. hohen Anteils mehrkerniger Oozyten bei der Gruppe III (Tabelle 6) lag die Polyspermierate mit insgesamt 15 % deutlich unter der von Leibfried-Rutledge et al. (1987) für in vitro gereifte Oozyten registrierten Polyspermierate von 32 % bzw. 22 %.

- in vivo Kulturergebnisse

Da bovine Oozyten zur effektiven Fertilisationsbeurteilung fixiert werden müssen, ist immer ein gewisser Anteil der nativen Oozyten, die auf Zwischenspiänger übertragen werden, potentiell unbefruchtet oder polysperm, und damit von vornherein nicht entwicklungsfähig (Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Dementsprechend wurde in den eigenen Versuchen, vermutlich v.a. aufgrund der relativ hohen Polyspermieraten, nur eine Teilungsrate von 23,1 % erzielt, während Lutterbach (1987) in vergleichbaren Versuchen bei einer Polyspermierate von nur 4,4 % eine Teilungsrate von 46,2 % erreichte.

Inwieweit die in vivo Kulturergebnisse von der Oozytenvorbereitung bzw. von der An- oder Abwesenheit von Kumuluszellen beeinflusst wurden, sollten die Ergebnisse der fünften Versuchsreihe zeigen. Hierbei wurden die Oozyten der Gruppen I und III getrennt übertragen.

Es stellte sich heraus, daß die, im Vergleich zu Lutterbach, geringere Wiederfindungsrate (83,3 % vs. 56,2 %) vermutlich v.a. durch den verhältnismäßig hohen Verlust an Oozyten der Gruppe III bedingt war. Beim direkten Vergleich zwischen Gruppe I und III zeigte sich nämlich, daß von der Gruppe I 76,5 % der übertragenen Oozyten wiedergewonnen werden konnten, aber von der Gruppe III nur 34,5 %.

Besüglich der Degenerationsraten zeigten sich analoge Zusammenhänge. So ist die, im Vergleich zu Lutterbach, hohe Degenerationsrate (10,3 % vs. 19,9 %) vermutlich auf den erhöhten Anteil degenerierter Oozyten aus der Gruppe III (43,3 %) zurückzuführen.

Allerdings war der Einfluß der Oozytenvorbereitung bzw. der Polyspermierate auf die Teilungsrate, trotz entsprechend deutlicher Unterschiede zwischen den Polyspermieraten beider Gruppen, zwar erkennbar (Gruppe I: 14,5 %; III: 10,0 %), aber nicht überzeugend.

Xu et al. (1986) berichten von einer ca. 60 %igen Parthenogeneserate bei in vitro gereiften und fertilisierten Rinder-oozyten nach in vivo Kultur im ligierten Kanincheneileiter.

Im Gegensatz dazu waren in den vorliegenden in vitro Fertilisationsversuchen insgesamt nur 1,7 % (max. 4,4 %) der Kontroll-oozyten parthenogenetisch aktiviert, und auch nach in vivo Kultur waren in der Parthenogenesekontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) weniger Oozyten geteilt (8,5 %), als bei den fertilisierten Oozyten (23,1 %).

In der fünften Versuchsreihe war zwar weder bei Gruppe I noch bei Gruppe III eine statistische Differenzierung zwischen Teilung und parthenogenetischer Aktivierung möglich, doch waren auch hier die Parthenogeneseraten vergleichsweise niedrig (I: 6,3 %; III: 0,0 %).

Zusammenfassend kann man folgern daß

- das geschüttelte Inkubationssystem die vollständige Reifung der Oozyten in Granulosazellkultur förderte, aber zusätzliche Supplementierungen (Ostradiol, Retinol) in den vorliegenden Versuchen keine Verbesserung erbrachten.
- die Reifung der Oozyten bei 39°C, auch bei Kokultur mit Granulosazellen (statisches System), die physiologische Befruchtung fördert.
- expandierte Komulustellen sich auf die physiologische Fertilisierbarkeit und eingeschränkt auch auf die in vivo Kultursergebnisse (Wiederfindung, Degeneration) positiv auswirken.

5.3 Einfluß der in vitro Fertilisationsfähigkeit einzelner Bullen auf die Fertilisationsergebnisse

Die in vitro Fertilisationsfähigkeit neun verschiedener Bullen (s. 3.5) wurde in der ersten Versuchsreihe durch IVF mit sowohl im statischen als auch mit im geschüttelten Inkubationssystem gereiften Oozyten bestimmt.

In Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen (s. 2.4.3.2) konnten in den vorliegenden Untersuchungen z.T. beträchtliche Unterschiede in der in vitro Fertilisationsfähigkeit der getesteten Bullen festgestellt werden.

Hierbei zeigte sich, daß mit dem Spermä eines Bullen (Napoleon) sowohl mit im statischen als auch mit im geschüttelten System gereiften Oozyten die höchsten Aktivierungsraten erzielt wurden. Die Rangfolge der übrigen Bullen änderte sich je nach verwendeten Inkubationssystem (Tabelle 4b).

Auch bei Zusammenfassung der Ergebnisse aus beiden Kultursystemen behielt der Bulle Napoleon die Spitzenstellung bezüglich der Aktivierungsrate und das Spermä eines Bullen (Halpert) war überhaupt nicht in der Lage Eizellen in vitro zu aktivieren.

Beim Vergleich der Aktivierungsraten mit den Non-return Raten von sieben Bullen (Tabelle 5) konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe dieser in vivo Fertilitätsparameter und der in vitro Fertilisationsfähigkeit gefunden werden.

Zum gleichen Ergebnis gelangte Xu (1987) beim entsprechenden Vergleich von drei Bullen.

Somit kann gefolgert werden, daß kein erkennbarer Zusammenhang zwischen der in vivo und in vitro Fertilität von Bullen besteht, und daß demnach die IVF unter diesen Bedingungen nicht als Fertilitätstest herangezogen werden kann.

Dies steht in direktem Widerspruch zu den Ergebnissen von Bousquet und Brackett (1982) und zu Vermutungen einiger anderer Forscher (s. 2.4.3.2).

Ob die niedrigen in vitro Penetrationsraten einiger wertvoller Bullen ein, wie Greve et al. (1986) befürchten, ernsthaf-

tes Hindernis für den verbreiteteren Einsatz der IVF in der praktischen Tierzucht bedeuten, sollte, angesichts der widersprüchlichen Aussagen, durch weitere, umfangreiche Versuche geklärt werden.

5.4 Effizienz der IVM und IVF Programme

Wie zahlreiche Berichte aus der Literatur zeigen, können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gereifte Rinderoozyten erfolgreich *in vitro* fertilisiert werden (2.2.1 und 2.4.1). Allerdings werden bei der *in vitro* Produktion von Rinderembryonen geringere Erfolgsraten als unter ausschließlichen *in vivo* Bedingungen erzielt.

Aus den Ergebnissen einiger Publikationen errechneten First und Parrish (1987) die Effizienz der einzelnen Stufen, die zur erfolgreichen IVF von Rinderoozyten gehören. Hierbei stellte sich heraus, daß zwar die einzelnen Teilschritte der IVF Programme relativ effizient erscheinen (Reifung, Penetration und Wiedergewinnung: 80 %), aber die Gesamteffizienz mit wenig mehr als 10 % lebenden Nachkommen (bezogen auf gereifte Oozyten) noch gering ist. Dabei scheint gegenwärtig der am meisten limitierende Schritt die Entwicklung der Embryonen vom Vorkern- zum Blastozystenstadium zu sein (55 %).

In den eigenen Versuchen konnten bei der Oozytenreifung und -aktivierung zu den von First und Parrish (1987) gefundenen Werten vergleichbare Effizienzen (75 % und 89 %) erreicht werden (Tabelle 11). Die Effizienzen der Wiedergewinnung (56 %) und Weiterentwicklung (23 % bzw 8 %) waren jedoch deutlich geringer. Hierbei muß aber in Betracht gezogen werden, daß sich die von First und Parrish zitierten Effizienzen der Wiederfindungs- und Entwicklungsraten auf *in vivo* gereifte Oozyten beziehen, die im Schafeileiter kultiviert wurden und somit mit den vorliegenden Ergebnissen diesbezüglich nicht verglichen werden können. Außerdem wurden die Wiederfindungs- und vermutlich auch die Weiterentwicklungs-

rate in den vorliegenden Versuchen (s. 5.2) vor allem von der Art der Oozytenvorbereitung beeinflusst. Dies ist wahrscheinlich auch ein wesentlicher Grund für die im Vergleich zu Critser et al. (1986) - die Kinderoozyten in Granulosakonstrukturen reifen und nach IVF im Schafeileiter kultivierten - niedrige Rate an Morulae (8 % vs. 36 %).

Eine weitere Ursache für die vergleichsweise niedrige Entwicklungsrate bzw. -effizienz lag in der Verwendung von Kaninchen als Zwischenempfänger liegen. Zwar fand Luttrell (1987) Kaninchen und Schaf gleichermassen als Zwischenempfänger geeignet, doch erzielte Xu (1987) mit Kaninchen als Empfänger so unzufriedenstellende Ergebnisse, daß er sich, trotz des höheren versuchstechnischen Aufwandes, für Färden als Zwischenempfänger entschied.

Auch in Anbetracht der in dieser Arbeit erzielten geringen Gesamteffizienz von 0,6 % bezogen auf vitale Oozyten, kann man sagen, daß der Einsatz von IVM und IVF in der tierzüchterischen Praxis derzeit vor allem durch die niedrigen Erfolgsraten und weniger durch "Bullenunterschiede" (s. 5.3) eingeschränkt wird.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Rinderoozyten von Schlachtovarien wurden in Kokultur mit Granulosazellen (1×10^6 Zellen/ml) in verschiedenen Kultursystemen (statisch und geschüttelt), mit verschiedenen Medienzusätzen ($1 \mu\text{g/ml}$ 17- β -Ostradiol und $0,3 \mu\text{g/ml}$ Retinol) und bei verschiedenen Reifungstemperaturen (37°C und 39°C) bei 5 % CO_2 in Luft maximaler Feuchtigkeit 24 h gereift.

Als Reifungsmedium diente TCM 199 mit 10 % FKS, $10,0 \mu\text{g/ml}$ FSH und $0,1 \text{ mM}$ Pyruvat.

Von den getesteten Kulturmodifikationen erbrachte die Inkubation im geschüttelten System eine signifikante Steigerung der Meioserate im Vergleich zum statischen System (85,6 % vs. 73,6 %).

Der Einfluß der Kulturmodifikationen auf die vollständige, physiologische Reifung und somit die volle Weiterentwicklungsfähigkeit wurde durch IVF (Spermienanreicherung mit swimup, Kapazitation mit Heparin) und in vivo Zwischenkultur (im Kanincheneileiter) der in vitro gereiften Oozyten überprüft. Als Parthenogenesekontrolle dienten gereifte, nicht fertilisierte Oozyten.

Durch Reifung der Oozyten im geschüttelten Inkubationssystem wurde die vollständige Reifung insgesamt gefordert (8 % Morulae), die zusätzlichen Supplementierungen (Ostradiol, Retinol) erbrachten in den vorliegenden Versuchen keine eindeutige Verbesserung.

Die Reifung der Oozyten bei 39°C (statisches System) verbesserte bei Kokultur mit Granulosazellen die physiologische Befruchtung (89,4 % Oozyten mit zwei Vorkernen) im Vergleich zu bei 37°C im statischen System gereiften Eizellen (78,5 % Oozyten mit zwei Vorkernen).

Daneben wurde der Einfluß des Entferns von Kumuluszellen vor der IVF auf die Fertilisations- und Kulturergebnisse, sowie die in vitro Fertilisationsfähigkeit von neun verschiedenen Bullen untersucht.

Die Anwesenheit expandierter Kumuluszellen bei der IVF forderte die physiologische Fertilisierbarkeit (signifikant höhere Rate an zwei Vorkernen als denudierte oder teilweise denudierte Oozyten). Auch auf Teilbereiche der in vivo Kulturergebnisse wirkten sich expandierte Kumuluszellen positiv aus (signifikant höhere Wiederfindungsrate und signifikant geringere Degenerationsrate im Vergleich zu denudierten Oozyten).

Beim Vergleich der in vitro Fertilisationsfähigkeit von neun verschiedenen Bullen konnten deutliche, individuelle Unterschiede, und kein Zusammenhang mit in vivo Fertilitätsparametern festgestellt werden.

Zwar konnten im vorliegenden IVM/IVF Programm Oozyten vollständig gereift werden (Morulae), jedoch war die Gesamteffizienz mit 0,6 % erzielten Morulae (bezogen auf vitale Oozyten) vergleichsweise gering.

Als mögliche Ursachen wurden Einflüsse der Oozytenvorbereitung (Kumuluszellen) und in vivo Kulturbedingungen (Kaninchen als Zwischenempfänger) diskutiert.

7. SUMMARY

IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

Bovine oocytes of ovaries obtained at a local abbatoir were matured in coculture with granulosa cells (1×10^6 cells/ml) using different culture systems (static and nonstatic), different media supplementations ($1 \mu\text{g/ml}$ 17- β -estradiol and $0,3 \mu\text{g/ml}$ retinol) and different maturation temperatures (37°C and 39°C).

The maturation medium was TCM 199 supplemented with 10 % FCS, $10,0 \mu\text{g/ml}$ FSH and $0,1 \text{ mM}$ pyruvate.

Of the culture modifications tested, the nonstatic system yielded a significant enhancement of the maturation rate compared to the static system (85,6 % vs. 73,6 %).

The influence of the culture modifications on the complete, physiological maturation and thus on the full developmental competence was examined by IVF (swimup separation and heparin capacitation of sperm) and by in vivo culture (in the rabbit oviduct) of the in vitro matured oocytes. Matured, not fertilized oocytes served as parthenogenetic controls.

Altogether the maturation of oocytes in the nonstatic culture system promoted the complete maturation (8 % morulae), further supplementations (estradiol, retinol) in these experiments rendered no definite improvement.

The physiological fertilization was improved by maturing the oocytes at 39°C rather than at 37°C in the presence of granulosa cells (89,4 % ova with two pronuclei vs. 78,5 %).

Furtheron the influence of removing cumulus cells from matured oocytes prior to IVF on fertilization and culture results, and the in vitro fertilizing ability of nine different bulls were examined.

The presence of expanded cumulus cells at IVF improved the physiological fertilization (significant higher rate of two pronuclei with cumulus enclosed oocytes compared to denuded or partly denuded oocytes). In accordance some parts of the in vivo culture results were positively influenced by the presence of expanded cumulus cells (significant higher recovery rate and significant lower degeneration rate with cumulus enclosed oocytes than with denuded ones).

Comparing the in vitro fertilizing ability of nine different bulls, distinct individual differences between the tested bulls could be found which did not correspond to in vivo fertility parameters.

Though oocytes could be matured completely in this IVM/IVF program, the overall efficiency resulting in .6 % morulae (referring to vital oocytes) was comparatively low.

Influences of oocyte preparation (cumulus cells) and in vivo culture conditions (does as intermediate recipients) were discussed as possible reasons.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Albertini, D.F., 1984
 Novel Morphological approaches for the study of oocyte maturation
 Biol. Reprod. 30, 13-28
- Austin, C.R., 1951
 Observations on the penetration in the sperm into the mammalian egg
 Aust. J. Sci. Res. B 4, 581-596
- Bae, I.-H., R.H. Foote, 1975
 Utilization of glutamine for energy and protein synthesis by cultured rabbit follicular oocytes
 Exp. Cell. Res. 90, 432-436
- Baker, R.D., C. Polge, 1976
 Fertilization in swine and cattle
 Can. J. Anim. Sci. 56, 105
- Balakier H., A.K. Tarkowski, 1980
 The role of germinal vesicle karyoplasm in the development of male pronucleus in the mouse
 Exp. Cell. Res. 128, 79-85
- Ball, G.D., N.L. First, 1983
 Fertility of ejaculated bull sperm after exposure to caffeine and cAMP
 J. Anim. Sci. 57 (Suppl. 1), 317
- Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister, N.L. First, 1983
 Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes
 Biol. Reprod. 28, 717-725
- Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.L. Ax, N.L. First, 1984
 Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro
 J. Dairy. Sci. 67, 2775-2785
- Barckhausen, R., J. Lootz, W. Schwemmler, W. Heger, J.B.P. Lüdke, S. Seipel, K.-U. Hollihn, C. Pulvermacher, K. Timmer, 1981
 Kompendium Biologie für Mediziner
 Gustav Fischer Verlag Stuttgart-New York
- Bavister, B.D., 1988
 Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro
 Theriogenology 29, 143-154

- Bavister, B.D., R. Yanagimachi, 1977
The effects of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm in vitro
Biol. Reprod. 16, 228-237
- Bedford, J.M., 1969a
Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa
J. Reprod. Fert., Suppl. 8, 19-26
- Bedford, J.M., 1969b
Morphological aspects of sperm capacitation in mammals
Adv. Biosci. 4, 35-50
- Bedford, J.M., 1974
Endocrine regulation of sperm capacitation
In: Proc. 4th Internat. Symp. on Endocrinol. 1973, pp.939-943
- Bedford, J.M., 1983
Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals
Biol. Reprod. 28, 108-120
- Bedirian, K.N., B.F. Shea, R.D. Baker, 1975
Fertilization of bovine follicular oocytes in bovine and porcine oviducts
Can. J. Anim. Sci. 55, 251-256
- Betteridge, K.J., 1988
The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos
Theriogenology 29, 155-187
- Boland, M.P., 1984
Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs
Theriogenology 21, 126-137
- Bondioli, K.R., R.W. Wright, Jr., 1983
In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro
J. Anim. Sci. 57, 1001
- Bousquet, D., B.G. Brackett, 1982
Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage
Theriogenology 17, 199-213
- Brackett, B.G., 1983
A review of bovine fertilization in vitro
Theriogenology 19, 1-15
- Brackett, B.G., G. Oliphant, 1975
Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro
Biol. Reprod. 12, 260-274

- Bracket, B.G., Y.K. Oh, J.F. Evans, W.J. Donawick, 1980
Fertilization and early development of cow ova
Biol. Reprod. 23, 189-205
- Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans, M.A. Dressel, 1982
Normal development following in vitro fertilization in the cow
Biol. Reprod. 27, 147-158
- Brackett, B.G., C.L. Keefer, C.G. Troop, W.J. Donawick, K.A. Bennett, 1984
Bovine twins resulting from in vitro fertilization
Theriogenology 21, 224
- Bregulla, K., U. Gerlach, R. Hahn, 1974
Versuche zur extrakorporalen Reifung, Befruchtung und Embryonen-
nuzucht mit Rinderkeimzellen
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81, 445-476
- Breuer, D.J., M.E. Wells, 1977
Effects of in vitro incubation of bovine spermatozoa in
bovine follicular fluid
J. Anim. Sci. 44, 262-265
- Brinster, R.L., 1963
A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell
to blastocyst
Exp. Cell. Res. 32, 205-208
- Byrd, W., 1981
In vitro capacitation and the chemically induced acrosome
reaction in bovine spermatozoa
J. Exp. Zool. 215, 35-46
- Callesen, H., T. Greve, P. Hyttel, 1986
Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovu-
lated cattle
Theriogenology 25, 71-86
- Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou, Y. Menezo, 1984
Cleavage beyond the block stage and survival after transfer
of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles
J. Reprod. Fert. 72, 479-485
- Chang, M.C., 1951
Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallo-
pian tubes
Nature, London 168, 697-698
- Channing, C.P., 1978
Follicular non-steroidal regulators
In: Ovarian follicular and corpus luteum function
C.P. Channing ed. Plenum Press N.Y. pp. 327-345

Channing, C.P., A. Tsafiri, 1977

Mechanism of action of LH and FSH upon the ovary in vitro
Metabolism 26, 413-468

Channing, C.P., S.H. Pomerantz, In-Ha Bae, V.W. Evans, S.J.
Atlas, 1982

Action of hormones and other factors upon oocyte maturation
In: Intraovarian control mechanisms

C.P. Channing, S.J. Segal, eds. Plenum Press N.Y. pp. 189-210

Chen, J., X. Yang, Y. Chen, R.H. Foote, 1988

In vitro fertilization in rabbits with spermatozoa capacitated
in defined medium with or without lysophosphatidyl choline

Theriogenology 29, 237

Cran, D.G., R.M. Moor, 1980

The development of oocytes and ovarian follicles of mammals
Sci. Prog. Oxf. 66, 371-38

Cran, D.G., W.T.K. Cheng, 1985

Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation
Gamete Res. 11, 311-319

Critser, E.S., M.L. Leibfried, 1984

Persönliche Mitteilung

Critser, E.S., M.L. Leibfried, N.L. First, 1984

The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro
fertilization of bovine oocytes

Theriogenology 21, 625-631

Critser, E.S., M.L. Leibfried-Rutledge, W.H. Eyestone, D.L.
Northey, N.L. First, 1986

Acquisition of developmental competence during maturation in
vitro

Theriogenology 25, 150

Critser, E.S., M.L. Leibfried-Rutledge, N.L. First, 1987

Influence of cumulus cell association during in vitro maturation
of bovine oocytes on embryonic development

Biol. Reprod. 34 Suppl. 1, 192

Crozet, N., 1984

Ultrastructural aspects of in vivo fertilization in the cow
Gamete Res. 10, 241-251

Dekel, N., P.F. Kraicer, 1978

Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by
gonadotropins and adenosine 3',5'-monophosphate

Endocrinology 102, 1797-1802

Dekel, N., W.H. Beers, 1980

Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus

Dev. Biol. 75, 247-254

Downs, S.M., D.L. Coleman, P.F. Ward-Bailey, J.J. Eppig, 1985
Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 454-458

Edwards, R.G., 1965

Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes

Nature 208, 349-351

Eppig, J.J., 1979

Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: General conditions for expansion in vitro

J. Exp. Zool. 208, 111-120

Eppig, J.J., 1980a

Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro

Biol. Reprod. 23, 545-552

Eppig, J.J., 1980b

Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro

Biol. Reprod. 22, 629-633

Eppig, J.J., P.F. Ward-Bailey, 1982

The mechanism of cumulus cell-oocyte uncoupling: evidence for the participation of both cumulus cells and oocytes

Gam. Res. 6, 145-154

Eppig, J., S.M. Downs, 1984

Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation

Biol. Reprod. 30, 1-11

Eppig, J.J., A.C. Schroeder, 1986

Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects

Theriogenology 25, 97-106

Eyestone, W.H., D.L. Northey, M.L. Leibfried-Rutledge, 1985

Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct

Biol. Reprod. 32 (Suppl. 1), 100

Eyestone, W.H., N.L. First, 1986

A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro

Theriogenology 25, 152

Eyestone, W.H., M.L. Leibfried-Rutledge, D.L. Northey, B.G. Gilligan, N.L. First, 1987a

Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct

Theriogenology 28, 1-7

Eyestone, W.H., J. Vignieri, N.L. First, 1987b

Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium

Theriogenology 27, 228

First, N.L., J.J. Parrish, 1987

In-vitro fertilization of ruminants

J. Reprod. Fert., Suppl. 34, 151-165

Flechon, J.E., A. Pavlok, 1986

Ultrastructural study of the interactions and fusion of ram spermatozoa with zona-free hamster oocytes

Reprod. Nutr. Develop. 26, 999-1008

Foote, W.D., C. Thibault, 1969

Investigations on in vitro maturation of cow and pig oocytes

Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 9, 329-349

Fukui, Y., Y. Sakuma, 1980

Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells

Biol. Reprod. 22, 669-673

Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki, H. Ono, 1982

Effect of gonadotropins, steroid and culture media on bovine oocyte maturation in vitro

Theriogenology 18, 161-175

Fukui, Y., M. Fukushima, H. Ono, 1983a

Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures

Theriogenology 20, 651-660

Fukui, Y., M. Fukushima, H. Ono, 1983b

Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro

J. Exp. Zool. 226, 137-142

Fukui, Y., A.M. Glew, F. Gandolfi, R.M. Moor, 1988

Ram-specific effects on in vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro

J. Reprod. Fert. 82, 337-340

Fukushima, M., Y. Fukui, 1985

Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilization of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro

Anim. Reprod. Sci. 9, 323-332

Fulka, J., Jr., 1983

Nuclear maturation in pig and rabbit oocytes after interspecific fusion

Exp. Cell. Res. 146, 212-218

Fulka, J., Jr., A. Pavlok, J. Fulka, 1982

In vitro fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture

J. Reprod. Fert. 64, 495-499

Gandolfi, F., R.M. Moor, 1987

Evaluation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells

J. Reprod. Fert. 81, 23-28

Garbers, D., N.L. First, H.A. Lardy, 1973

The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors

Biol. Reprod. 8, 589-598

Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi, 1988
Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in vitro and their transfer to the cow uterus

Theriogenology 29, 251

Graham, C.F., 1974

The production of parthenogenetic mammalian embryos and the use in biological research

Biol. Rev. 49, 399-422

Graham, J.K., R.H. Foote, S.R. Hough, 1987

Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from bull, ram, stallion and boar

Biol. Reprod. 37, 181-188

Greve, T., D. Bousquet, W.A. King, K.J. Betteridge, 1984

In vitro fertilization and cleavage of in vivo matured bovine oocytes

Theriogenology 22, 151-165

Greve, T., K.P. Xu, H. Callesen, P. Hyttel, 1986

GTF-Seminar: Embryo transfer and related biotechnologies in farm animals, Mariensee

Le Guienne, B., M. Thibier, C. Thibault, 1987

Effet de l'héparine sur la fécondation in vitro d'ovocytes bovins matures in vitro

Proc. AETE-Meeting, Lyon

Hanada, A., 1985

In vitro fertilization of cattle: a specific reference to sperm capacitation with ionophore

Jpn. J. Anim. Reprod. 31, 56-61

- Hanada, A., V. Enya, T. Suzuki, 1986
Proc. 78th meeting of the Japanese Society of Zootechnical Science 1-36 p18
- Handrow, R.R., R.W. Lenz, R.L. Ax, 1982
Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa
Biochem. Biophys. Res. Comm. 107, 1326-1332
- Hay, M.F., R.M. Moor, 1975
Functional and structural relationship in the graafian follicle population of the sheep ovary
J. Reprod. Fert. 45, 583-593
- Hensleigh, H.C., A.G. Hunter, 1983
Influence of FSH and HCG upon the in vitro maturation of bovine oocytes
Theriogenology 19, 133
- Hensleigh, H.C., A.G. Hunter, 1985
In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage
J. Dairy Sci. 68, 1456-1562
- Herz, Z., D. Northey, M. Lawyer, N.L. First, 1985
Acrosome reaction of bovine spermatozoa in vivo: sites and effects of stages and estrous cycle
Biol. Reprod. 32, 1163-1168
- Heyman, Y., Y. Menezo, P. Chesne, S. Camous, V. Garnier, 1987
In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles
Theriogenology 27, 59-68
- Hillensjö, T., C. Ekholm, K. Ahren, 1978
Role of cyclic AMP in oocyte maturation and glycolysis in the pre-ovulatory rat follicle
Acta Endocrinol. 87, 377-388
- Hillensjö, T., C.P. Channing, S.H. Pomerantz, A. Schwartz-Krippner, 1979
Intrafollicular control of oocyte maturation in the pig
In Vitro 15, 32-39
- Hunter, A.G., R.M. Moor, 1987
Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro
J. Dairy Sci. 70, 1646-1651
- Hunter, R.H.F., I. Wilmut, 1984
Sperm transport in the cow: peri-ovulatory distribution of viable cells within the oviduct
Reprod. Nutr. Develop. 24, 597-608

- Hyttel, P., H. Callesen, T. Greve, 1986a
Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle
J. Reprod. Fert. 76, 645-656
- Hyttel, P., K.P. Xu, T. Greve, 1986b
Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle
J. Reprod. Fert. 78, 615-625
- Hyttel, P., K.P. Xu, S. Smith, H. Callesen, T. Greve, 1987
Ultrastructure of the final maturation of bovine oocytes in vitro
Anat. Embryol. 176, 35-40
- Hyttel, P., T. Greve, H. Callesen, 1988
Ultrastructure of in-vivo fertilization in superovulated cattle
J. Reprod. Fert. 82, 1-13
- Ireland, J.J., R.L. Murphee, P.B. Coulsen, 1980
Accuracy of predicting stages of bovine estrus cycle by gross appearance of the corpus luteum
J. Dairy Sci. 63, 155-160
- Iritani, A., 1987
In vitro fertilization in cattle by routine method and micro-fertilization in the rabbits
Symposium on biotechnology in animal breeding, 11.-14. Nov. Japanese-German Centre, Berlin
- Iritani, A., K. Niwa, 1977
Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture
J. Reprod. Fert. 50, 119-121
- Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa, H.B. Song, 1984
Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium
J. Reprod. Fert. 70, 487-492
- Iritani, A., K. Utsumi, M. Miyake, Y. Yamaguchi, 1986
Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa
Dev. Growth & Differ., Suppl. 28, 45
- Jagiello, G., M.B. Ducayen, R. Downey, A. Jonassen, 1982
Alteration of mammalian oocyte meiosis I with divalent cations and calmodulin
Cell Calcium 3, 153-162

- Kanagawa, H., O. Abas-Mazni, C.A. Valdez, 1986
Oocyte maturation and in vitro fertilization
Expert consultation on biotechnology for livestock production
and health, Rome
- Kaplan, R., N. Dekel, P.F. Kraicer, 1978
Acceleration of onset of oocyte maturation in vitro by lutei-
nizing hormone
Gamete Res. 1, 59-63
- Katska, L., Z. Smorag, 1985
The influence of culture temperature on in vitro maturation
of bovine oocytes
Anim. Reprod. Sci. 9, 205-212
- Kauffold, P., H. Torner, D. Schmidt, S. Blottner, P. Rommel,
1988
Fertilization in vitro of bovine oocytes matured in vivo
Theriogenology 29, 266
- Keefer, C.L., B.G. Brackett, C.G. Troop, 1985
Bovine fertilization after in vitro insemination with retile
sperm fractions
Theriogenology 23, 198
- King, W.A., A. Niar, I. Chartrain, K.J. Betteridge, P. Guay,
1988
Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment
bovine embryos
J. Reprod. Fert. 82, 87-95
- Kruip, Th.A.M., S.J. Dieleman, 1982
Macroscopic classification of bovine follicles and its vali-
dation by micromorphological and steroid biochemical procedu-
res
Reprod. Nutr. Develop. 22, 465-473
- Kruip, T.A.M., D.G. Cran, T.H. van Beneden, S.J. Dieleman,
1983
Structural changes in bovine oocytes during final maturation
in vivo
Gamete Res. 8, 29-47
- Kuzan, F.B., R.W. Wright, Jr., 1981
Coculture of bovine embryos with bovine fibroblasts
Theriogenology 15, 115
- Kuzan, F.B., R.W. Wright, Jr., 1982a
Observations on the development of bovine morulae on various
cellular and noncellular substrata
J. Anim. Sci. 54, 811-816

- Kuzan, F.B., R.W. Wright, Jr., 1982b
Blastocyst expansion, hatching, and attachment of porcine embryos cocultured with bovine fibroblasts in vitro
Anim. Reprod. Sci. 5, 57-63
- Lambert, R.D., M.A. Sirard, C. Bernard, R. Beland, J.E. Rioux, P. Leclerc, D.P. Menard, M. Bedoya, 1986
In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy
Theriogenology 25, 117-133
- Langman, J., 1980
Medizinische Embryologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York
- Langlais, J., D.R. Roberts, 1985
A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa
Gamete Res. 12, 183-224
- Lee, C.N., R.L. Ax, 1984
Concentrations and compositions of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract
J. Dairy Sci. 67, 2006-2009
- Lee, C.N., M.K. Clayton, S.M. Bushmeyer, N.L. First, R.L. Ax, 1986
Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro
J. Anim. Sci. 63, 861-867
- Leibfried, L., N.L. First, 1979a
Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro
J. Anim. Sci. 48, 76-86
- Leibfried, L., N.L. First, 1979b
Effects of divalent cations on in vitro maturation of bovine oocytes
J. Exp. Zool. 210, 575-580
- Leibfried, L., N.L. First, 1980
Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro
Biol. Reprod. 23, 699-704
- Leibfried, M.L., B.D. Bavister, 1981
The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster
Gamete Res. 4, 57-63

- Leibfried, M.L., B.D. Bavister, 1982
Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster
J. Reprod. Fert. 66, '87-93
- Leibfried, M.L., B.D. Bavister, 1983
Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters
J. Exp. Zool. 226, 481-485
- Leibfried, M.L., E.S. Critser, N.L. First, 1985
Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle
Theriogenology 23, 753-759
- Leibfried-Putledge, M.L., E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey, N.L. First, 1986a
Developmental potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo
Theriogenology 25, 164
- Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, N.L. First, 1986b
Effects of fetal calf serum and bovine serum albumine on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes
Biol. Reprod. 35, 850-857
- Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey, N.L. First, 1987
Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo
Biol. Reprod. 36, 376-383
- Lenz, R.W., R.L. Ax, H.J. Grimek, N.L. First, 1982
Proteoglycan from bovine follicular fluid stimulates an acrosome reaction in bovine spermatozoa
Biochem. Biophys. Res. Comm. 106, 1092-1098
- Lenz, R.W., G.D. Ball, M.L. Leibfried, R.L. Ax, N.L. First, 1983a
In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes
Biol. Reprod. 29, 173-179
- Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N.L. First, R.L. Ax., 1983b
Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization
Biol. Reprod. 28, 683-690

- Lindner, H.R., A. Tsafiri, M.E. Lieberman, U. Zor, Y. Koch, S. Bauminger, A. Barnea, 1974
Gonadotropin action on cultured graafian follicles: induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell
Rec. Prog. Horm. Res. 30, 79-138
- Lu, K.H., I. Gordon, M. Gallagher, H. McGovern, 1987a
Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro
Veterinary Record 121, 259-260
- Lu, K.H., I. Gordon, H.B. Chen, H. McGovern, 1987b
In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro
Proc. AETE-meeting, Lyon
- Lussier, J.G., P. Matton, J.J. Dufour, 1987
Growth rates of follicles in the ovary of the cow
J. Reprod. Fert. 81, 301-307
- Lutterbach, A., 1987
In vitro Produktion von Rinderzygoten
München: Diss. med. vet.
- Lutterbach, A., R.A. Koll, G. Brem, 1987
In vitro maturation of bovine oocytes in coculture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development
Zuchthyg. 22, 145-150
- Mahi-Brown, C.A., R. Yanagimachi, 1983
Parameters influencing ovum pickup by oviductal fimbria in the golden hamster
Gamete Res. 8, 1-10
- Maruska, D.V., M.L. Leibfried, N.L. First, 1984
Role of calcium and calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complexes
Biol. Reprod. 31, 1-6
- Masui, Y., H.J. Clarke, 1979
Oocyte maturation
Int. Rev. Cytol. 57, 185-282
- Meinecke, B., S. Meinecke-Tillmann, 1979
Experimental studies on fertilization of extracorporal matured oocytes of cattle in heterologous recipients
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 86, 477-479
- Meinecke-Tillmann, S., B. Meinecke, 1980
Polyspermie beim Rind
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 246-248

- Midgley, A.R., 1973
 Autoradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections
 Adv. Exp. Med. Biol. 36, 365
- Miller, D.J., A.G. Hunter, 1986
 Effect of osmolarity and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm
 J. Dairy Sci. 69, 2915-2924
- Miller, K.F., V.G. Pursel, 1987
 Absorption of compounds in medium by oil covering microdrop cultures
 Gamete Res. 17, 57-61
- Moor, R.M., 1978
 Role of steroids in the maturation of ovine oocytes
 Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 18, 477-482
- Moor, R.M., A.O. Trounsen, 1977
 Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity
 J. Reprod. Fert. 49, 101-109
- Moor, R.M., M.F. Hay, H.M. Dott, D.G. Cran, 1978
 Macroscopic identification and steroidogenetic function of atretic follicles in sheep
 J. Endocr. 77, 309-318
- Moor, R.M., G.M. Warnes, 1978
 Regulation of oocyte maturation in mammals
 In: Control of ovulation. Crighton, D.B., G.R. Foxcroft, eds.
 Butterworth London, pp. 159-176
- Moor, R.M., M.W. Smith, R.M.C. Dawson, 1980a
 Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers
 Exp. Cell. Res. 126, 15-29
- Moor, R.M., C. Polge, S.M. Willadsen, 1980b
 Effect of steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes
 J. Embryol. exp. Morph. 56, 319-335
- Moor, R.M., J.P. Heslop, 1981
 Cyclic AMP in mammalian follicle cells and oocytes during maturation
 J. Exp. Zool. 216, 205-209

- Moor, R.M., I.M. Crosby, J.C. Osborn, 1983
Growth and maturation of mammalian oocytes
In: In vitro fertilization and embryo transfer.
Proc. of the Serono Clinical Colloquia on Reproduction.
Crosignani, P.G., B.L. Rubin eds. Academic press, pp. 39-63
- Moor, R.M., T.A.M. Kruip, D. Green, 1984
Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation ?
Theriogenology 21, 103-116
- Moor, R.M., R.F. Seamark, 1986
Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals
J. Dairy Sci. 69, 927-943
- Motlik, J., H.H. Koefoed-Johnsen, J. Fulka, 1978
Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro
J. Exp. Zool. 205, 377-384
- Motlik, J., J. Fulka, 1986
Factors affecting meiotic competence in pig oocytes
Theriogenology 25, 87-96
- Motlik, J., J. Fulka, J.-E. Flechon, 1986
Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro
J. Reprod. Fert. 76, 31-37
- Newcomb, R., 1982
Egg recovery and transfer in cattle
In: Mammalian egg transfer, C.R. Adams, ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 81-118
- Oliphant, G., A.B. Reynolds, T.S. Thomas, 1985
Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction
Am. J. Anat. 174, 269-283
- Osborn, J.C., R.M. Moor, 1983
Time-depent effects of α -amanitin on nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes
J. Embryol. exp. Morph. 73, 317-338
- Parrish, J.J., J.L. Parrish, N.L. First, 1984
Effect of swimup separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes
Proc. Soc. Study Reprod.

- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, N.L. First, 1985a
Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro
Theriogenology 24, 537-549
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, N.L. First, 1985b
Role of heparin in bovine sperm capacitation
Biol. Reprod. 32 (Suppl. 1), 211
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, N.L. First, 1985c
In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swimup separated frozen thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization
Theriogenology 23, 216
- Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone, N.L. First, 1986
Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen
Theriogenology 25, 591-599
- Pavlok, A., 1987
Persönliche Mitteilung
- Plante, L., D. Bousquet, P. Guay, 1986
Effect of different culture conditions on in vitro bovine embryo development
Theriogenology 25, 182
- Pomeroy, K.O., G.E. Seidel, Jr., 1985
An activating dose of ethanol is detrimental to fertilization and development of mouse ova
Theriogenologie 23, 218
- Powers, R.D., G.A. Paleos, 1982
Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse
J. Reprod. Fert. 66, 1-8
- Quinn, P., G.M. Harlow, 1978
The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro
J. Exp. Zool. 206, 73-80
- Racowsky, C., 1983
Androgenic modulation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent meiotic arrest
Biol. Reprod. 28, 775-787
- Racowsky, C., R.W. McGaughey, 1982
In the absence of protein, estradiol suppresses meiosis of porcine oocytes in vitro
J. Exp. Zool. 224, 103-110

- Richards, J.S., 1980
Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals
Physiol. Rev. 60, 51
- Richter, D.J., R.W. McGaughey, 1979
Specificity of inhibition by steroids of porcine oocyte maturation in vitro
J. Exp. Zool. 209, 81-90
- Rogers, B.J., 1981
Factors affecting mammalian in vitro fertilization
In: Bioregulators of Reproduction, G. Jagiello, H.J. Vogel eds., Academic Press, pp. 459-486
- Rüsse, I., 1978
Zur Entstehung der Zona Pellucida der Oocyte beim Rind
XIXth Morphological Congress Symposia Charles University Prague pp. 519-525
- Rüsse, I., 1982
Interzellularbrücken zwischen weiblichen Keimzellen bei Rind und Schaf
Verh. Anat. Ges. 76, 367-369
- Sanbuissho, A., W.R. Threlfall, 1985
The effects of estrus cow serum on the maturation and fertilization of bovine follicular oocyte in vitro
Theriogenology 23, 226
- Sanbuissho, A., W.R. Threlfall, 1988
The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation in vitro
Theriogenology 29, 301
- Sato, E., A. Iritani, Y. Nishikawa, 1977
Effects of energy sources on oocyte maturation in pig and cattle
Jap. J. Zootech. Sci. 48, 333-335
- Sato, E., A. Iritani, Y. Nishikawa, 1978
Maturation and activation of cattle follicular oocytes cultured in vitro
Jap. J. Zootech. Sci. 49, 236-242
- Sato, E., T. Ishibashi, A. Iritani, 1982
Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis
In: Intraovarian control mechanisms
C.P. Channing, S.J. Segal, eds. Plenum Press N.Y. pp. 161-173

Sato, E., S.S. Koide, 1984

A factor from bovine granulosa cells preventing oocyte maturation

Differentiation 26, 59-62

Sato, E., H. Ueno, S.S. Koide, 1986

Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and by heparin and heparan sulfate

Gamete Res. 13, 115-124

Sato, E., S. Koide, 1987

Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocytes

Int. Rev. Cytol. 106, 1-33

Schoff, P.K., H.A. Lardy, 1987

Effects of flouride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa

Biol. Reprod. 37, 1037-1046

Schultz, R.M., P.M. Wassarman, 1977a

Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse

J. Cell. Sci. 24, 167-194

Schultz, R.M., P.M. Wassarman, 1977b

Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro

Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 538-541

Schultz, R.M., G.E. Letourneau, P.M. Wassarman, 1978

Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: protein synthesis in nucleate and anucleate oocyte fragments

J. Cell. Sci. 30, 251-264

Schultz, R.M., R.R. Montgomery, P.F. Ward-Bailey, J.J. Eppig, 1983a

Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone

Dev. Biol. 95, 294-304

Schultz, R.M., R.R. Montgomery, J.R. Belanoff, 1983b

Regulation of mouse oocyte maturation: implications of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis

Dev. Biol. 97, 264-273

Schweigert, F.J., A. Lutterbach, W.A. Rambeck, H. Zucker, 1986

Vitamin A- and β -carotene concentrations in bovine follicular fluid in relationship to follicle size

J. Vet. Med. A, 33, 360-364

- Shalgi, R., N. Dekel, P.F. Kraicer, 1979
The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro
J. Reprod. Fert. 55, 429-435
- Shea, B.F., K.N. Bedirian, R.D. Baker, 1973
Sperm penetration of bovine follicular oocytes following in vitro and in vivo maturation
Biol. Reprod. 9, 84-85
- Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Bedirian, R.D. Baker, 1976
Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes
J. Animal. Sci. 43, 809-815
- Sirard, M.A., R.D. Lambert, 1985
In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy
Biol. Reprod. 33, 487-494
- Sirard, M.A., R.D. Lambert, D.P. Menard, M. Bedoya, 1985
Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in the rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus
J. Reprod. Fert. 75, 551-556
- Smith, B.J., M.F. Spire, D.L. Davis, R.R. Schalles, 1986
Bovine embryo development in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline and Ham's F-10 medium with hepes buffer
Theriogenology 25, 199
- Sreenan, J., 1970
In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes
J. agric. Sci. Camb. 75, 393-396
- Staigmiller, R.B., R.M. Moor, 1984
Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle
Gamete. Res. 9, 221-229
- Süss, U., K. Wüthrich, 1985
Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured in vitro
Theriogenology 23, 231
- Süss, U., G. Stranzinger, 1987a
In-vitro Reifung und Befruchtung von Rinderootzyten
Zuchthyg. 22, 114

Süss, U., G. Stranzinger, 1987b
 Characterization of in vitro matured and fertilized bovine oocytes
 Symposium on biotechnology in animal breeding, 11.-14. Nov.
 Japanese-German Centre, Berlin

Süss, U., K. Wüthrich, G. Stranzinger, 1987
 Potential for in vitro fertilization and embryonic development of in vitro matured bovine oocytes
 Theriogenology 27, 281

Susko-Parrish, J.L., J.J. Parrish, R.R. Handrow, 1985
 Glucose inhibits the action of heparin by an indirect mechanism
 Biol. Reprod. 32 (Suppl. 1), 80

Thibault, C., 1966
 La culture in vitro de l'oeuf de vache
 Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 6, 159-164

Thibault, C., 1977
 Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes
 J. Reprod. Fert. 51, 1-15

Thibault, C., M. Gerard, 1973
 Cytoplasmatic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro
 Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 13, 145-156

Thibault, C., M. Gerard, Y. Menezo, 1975
 Acquisition par l'ovocyte de lapin et de veau du facteur de decondensation du noyau du spermatozoïde fécondant (MPGF)
 Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 15, 705-714

Trounsen, A.O., S.M. Willadsen, L.E.A. Rowsen, 1977
 Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows
 J. Reprod. Fert. 51, 321-327

Tsafiri, A., 1978
 Mammalian oocyte maturation: model systems and their physiological relevance
 In: Ovarian follicular and corpus luteum function
 C.P. Channing ed. Plenum Press N.Y. pp. 269-281

Tsafiri, A., H.R. Lindner, U. Zor, S.A. Lamprecht, 1972
 In-vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E₂
 J. Reprod. Fert. 31, 39-50

- Tsafiri, A., C.P. Channing, 1975a
An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro
Endocrinology 96, 922-927
- Tsafiri, A., C.P. Channing, 1975b
Influence of follicular fluid and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro
J. Reprod. Fert. 43, 149-152
- Tsafiri, A., S.H. Pomerantz, C.P. Channing, 1976
Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor
Biol. Reprod. 14, 511-516
- Utsumi, K., H. Kato, A. Iritani, 1988
Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro
Theriogenology 29, 320
- Viriyapanich, P., J.M. Bedford, 1981
Sperm capacitation in the fallopian tube of the hamster and its suppression by endocrine factors
J. Exp. Zool. 217, 403-407
- Wassarman, P.M., R.M. Schultz, G.E. Letourneau, M.J. LaMarca, W.J. Josefowicz, J.D. Bleil, 1979
Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro
In: Ovarian follicular and corpus luteum function
C.P. Channing ed. Plenum Press N.Y. pp. 251-268
- Wheeler, M.B., G.E. Seidel, Jr., 1986
Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa
Theriogenology 25, 216
- Wheeler, M. B., G.E. Seidel, Jr., 1987
Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm
Gamete Res. 18, 237-250
- Wheeler, M.B., G.E. Seidel, Jr., 1988
Capacitation of bull sperm by lysophospholipids and trypsin
Theriogenology 29, 325
- Wiemer, K.E., G.F. Amborski, R.S. Denniston, K.L. White, R.A. Godke, 1987
Use of a hormone-treated fetal uterine fibroblast monolayer system for in vitro culture of bovine embryos
Theriogenology 27, 294
- Whittingham, D.G., 1980
Parthenogenesis in mammals
Oxford Reviews of Reproductive Biology 2, 205-232

Wolf, D.P., 1981

The mammalian egg's block to polyspermy

In: fertilization and embryonic development in vitro

L. Mastroianni, Jr., J.D. Biggers, eds., Plenum Press N.Y. and London, pp. 183-197

Wolf, G., 1984

Multiple functions of vitamin A

Physiol. Rev. 64, 873-937

Wright, R.W., Jr., G.B. Anderson, P.T. Cupps, M. Drost, 1976a
Successful culture in vitro of bovine embryos to the blastocyst stage

Biol. Reprod. 14, 157-162

Wright, R.W., Jr., G.B. Anderson, P.T. Cupps, M. Drost, 1976b
Blastocyst expansion and hatching of bovine ova cultured in vitro

J. Anim. Sci. 43, 170-174

Wright, R.W., Jr., K.R. Bondioli, 1981

Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals

J. Anim. Sci. 53, 702-729

Xu, K.P., 1987

Studies on the bovine follicular oocyte maturation and fertilization in vitro

Copenhagen: Ph.D. Thesis

Xu, K.P., T. Greve, S. Smith, P. Liehman, P. Hyttel, 1986

Parthenogenetic activation of cattle oocytes matured in vitro and cultured in rabbit oviducts

Theriogenology 25, 218

Xu, K.P., T. Greve, H. Callesen, P. Hyttel, 1987a

Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro

J. Reprod. Fert. 81, 501-504

Xu, K.P., R. Hoier, T. Greve, 1987b

Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocyte maturation in vitro

Theriogenology 27, 297

Xu, K.P., T. Greve, 1988

A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes

J. Reprod. Fert. 82, 127-134

Yanagimachi, R., 1981

Mechanisms of fertilization in mammals

In: fertilization and embryonic development in vitro

L. Mastroianni, Jr., J.D. Biggers, eds., Plenum Press N.Y.
and London, pp. 82-182

Zachariae, F., H. Thorsoe, 1966

Hormonal control of acid mucopolysaccharides in the female
genital tract

In: Hormones and connective tissue, G.A. Hensen, ed.

Munksgaard, Denmark, pp. 257-281

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AZ	Achtzeller
BSA	Bovines Serum Albumin
BSS	Balanced Salt Solution
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphat
dbcAMP	dibutyryl cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
CPE	Corona Penetrating Enzyme
DM	Defined Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DZ	Dreizeller
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate
ET	Embryo Transfer
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	3'6'-Fluorescein Diacetat
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung
GAG(s)	Glykosaminoglykan(e)
hGAG(s)	heparinähnliche Glykosaminoglykan(e)
GCF	Granulosa Cell Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIS	High Ionic Strength
IVF	In Vitro Fertilization
IVM	In Vitro Maturation
KCl	Kaliumchlorid
KGW	Körpergewicht
(m)KRB	(modifiziertes) Krebs-Ringer-Bikarbonatmedium
LH	Luteinisierendes Hormon
LPL	Lysophospholipide
M	Morula(e)

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	millimolar (mmol/l)
mOsm	milliOsmol
MPF	Maturation Promoting Factor
MPGF	Male Pronuclear Growth Factor
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
OMI	Oocyte Maturation Inhibitor
p.ov.	post ovulationem
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PHE	Penicillamin Hypotaurin Epinephrin
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonucleic Acid
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
SZ	Sechzehnzeller
(m)TALP	(modified) Tyrode Albumine Lactate Pyruvate
TBV	Trophoblastvesikel
TCM 199	Tissue Culture Medium 199
TG-Sperma	Tiefgefriersperma
TLE	Trypsin Like Enzyme
U	Units
VR	Versuchsreihe
vs.	versus
VZ	Vierzeller
ZZ	Zweizeller

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. habil. G. Brem möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit gewährte Beratung und Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Freundin Dr. Angela Lutterbach für ihre fachliche und menschliche Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Annette Clement-Sengewald, Frank Leichthammer, Ulrike Berg und Bernhard Hofmeister sowie bei Frau Beate Rengel, Frau Tamara Holy, Frau Sigrid Müller und allen Mitarbeitern des Lehrstuhles für Molekulare Tierzucht für die große Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Robert Koll und meinem Studienkollegen Dr. Markus Wierich danke ich für die durchgeführten Analysen und die gute Zusammenarbeit.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Stanglmeier und Herrn Professor Dr. Dr. Osterkorn für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium im Rahmen der Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses der Ludwig-Maximilians-Universität München gefördert.

LEBENS LAUF

Elisabeth Kreszenz Gradl	geboren am 26. Februar 1961 in Chieming
Eltern	Alfons Gradl, Landwirt Kreszenz Gradl, geb. Schrobenauser
Schulbildung	1967 - 1971 Grundschule in Chieming 1971 - 1980 Annette-Kolb-Gymnasium in Traunstein Abitur 27. Juni 1980
Studium	1980 - 1986 Studium der Veterinärme- dizin an der Ludwig-Maximilians-Uni- versität in München Staatsexamen 13. Februar 1986 Approbation 7. April 1986
Promotionsstudium	seit März 1986 Doktorandin am Insti- tut für Tierzucht und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät

